MONITOREO AMBIENTAL EN LA INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS

Dr Santiago Pablo Baggini

ACLARACIÓN LEGAL

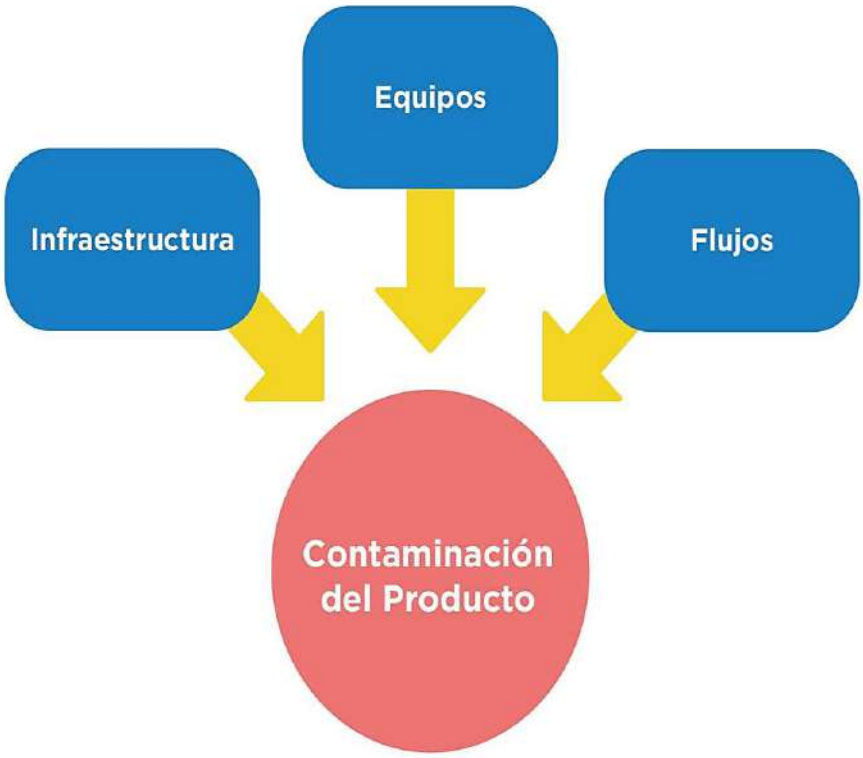
Las fotografías del presente documentos, son propiedad del autor y publicadas oportunamente con sus fuentes en su Blog Científico:
https://bagginis.blogspot.com/

SEGURIDAD ALIMENTARIA, BROMATOLOGÍA y MICROBIOLOGÍA de los ALIMENTOS

1. Programa de Monitoreo Ambiental (PMA): generalidades y glosario de términos

GENERALIDADES

En el campo de la industria de los alimentos, es insoslayable contar con un monitoreo ambiental para evitar la contaminación y cuidar la inocuidad alimentaria. Al hablar de monitoreo ambiental, inocuidad y calidad de los alimentos, se debe tener en cuenta que existen algunas bases en las que están cimentadas las buenas prácticas de manufactura y los programas de prerrequisitos: control de plagas, saneamiento, higiene personal, diseño higiénico de la planta y de los equipos, procedimientos operacionales y estándares de zonificación. Los programas de seguridad alimentaria han dependido de los programas de HACCP o APPCC para garantizar la seguridad y la calidad de los productos alimenticios. Sin embargo, dichos sistemas son pasibles de fallas, debido a factores tales como la falta verificación y validación de los programas de prerrequisitos, por ejemplo, la zonificación higiénica de la planta. Cabría entonces definir lo que es una verificación higiénica que está basada en el círculo de contaminación cruzada del producto.



Dentro de una cadena de producción existen áreas que cuentan con un riesgo bajo de contaminación, así como aquellas otras que cuentan con un mayor riesgo de contraer dicha contaminación, por ende, mejorar la zonificación higiénica, el saneamiento y el diseño higiénico, serán una parte fundamental del programa de monitoreo ambiental, como veremos más adelante, pues cuando se tiene un programa adecuado, también contaremos con un control preventivo agregado.

El principal objetivo de este programa de monitoreo ambiental (PMA), será el de prevenir la aparición de patógenos, ya que estos agentes son los principales causantes del deterioro alimentario. De esta manera, el evaluar e inspeccionar el ambiente para poder identificar los puntos de posible contaminación, se convierte en una tarea fundamental para la prevención de la inocuidad alimentaria. El PMA implantado, entonces, será nuestra forma más eficiente para evitar problemas de contaminación y deterioro del producto industrializado. También es utilizado para evaluar el proceso de limpieza de equipamientos, de superficies y con eso, controlamos la higiene de las mismas y la potencial contaminación del alimento.

Uno de los

beneficios que se pueden obtener con el monitoreo ambiental, es poder verificar el sistema de inocuidad de los alimentos, y para ello, se echará mano de los microorganismos patógenos. La metodología de recolección de muestreo deberá estar incluido en el programa de monitoreo ambiental ya que con este muestreo será posible identificar algún tipo de contaminación dentro de la cadena de producción y atacarlo de forma inmediata. El ambiente de las instalaciones en las que se manipulan y elaboran los alimentos puede ser una importante fuente de contaminación. Aunque existen diversos peligros asociados al ambiente, destacan por su repercusión los peligros microbiológicos de origen bacteriano.

En este sentido, las organizaciones deben implantar una serie de medidas de control para evitar o minimizar la entrada y anidamiento de estos patógenos en las instalaciones. Entre estas medidas se incluyen una serie de programas de prerrequisitos, entre los que destacan, el diseño higiénico de instalaciones y equipos, la zonificación higiénica, el plan de limpieza y desinfección, el plan de mantenimiento y las buenas prácticas de higiene del personal.

La implementación de estos programas de prerrequisitos debe ser verificada para poder garantizar que todas estas medidas de control están cumpliendo con el objetivo marcado. Aunque cada programa de prerrequisitos presenta sus propias actividades de verificación, el monitoreo se propone como una actividad que permite obtener una aproximación sobre la realidad higiénico-sanitaria de las instalaciones en su conjunto, porque permite no solo la detección de la presencia de agentes patógenos, sino porque facilita el análisis de tendencias, proporcionando información de gran relevancia para la organización.

Tal es su importancia, que estándares de calidad e inocuidad alimentaria como BRCGS Food, IFS Food o FSSC 22000 lo están exigiendo a las empresas que quieran certificarse, así como la Ley FSMA para la exportación de alimentos a EEUU. Por ejemplo, en la Norma de buenas prácticas de fabricación, análisis de peligros y controles preventivos basados en riesgos para alimentos humanos de la FSMA , muchos de los "controles preventivos" especificados representan programas que se habrían clasificado previamente como programas de requisitos previos. Sin embargo, los controles preventivos de la FSMA incluyen un requisito de verificación de los controles preventivos, que no estaba en vigor para los programas de requisitos previos.

En esta norma de FSMA se incluye un reconocimiento específico del monitoreo ambiental como una estrategia de verificación clave para ciertos controles preventivos que no son de proceso, como el saneamiento y la regla establece: **Monitoreo ambiental, para un patógeno ambiental o para un organismo indicador apropiado: La contaminación de un alimento listo para comer con un patógeno ambiental es un peligro que requiere un control preventivo mediante la recolección y el análisis de muestras ambientales.** Esta disposición demuestra el creciente consenso sobre la importancia de los programas de monitoreo ambiental como parte esencial de los sistemas de calidad y seguridad alimentaria.

El control del proceso ambiental contiene **tres pasos**: eliminación de los organismos residentes de interés del ambiente de procesamiento, manejo de los vectores y vías dentro de ese ambiente y uso de la metodología de control del proceso para medir y predecir la pérdida de control. El control de procesos ambientales utiliza el monitoreo ambiental como una herramienta clave. El monitoreo ambiental mide el riesgo presente en el ambiente de procesamiento y también evalúa los obstáculos establecidos para controlar la entrada de patógenos.

Esto requiere que se muestreen varios sitios en el entorno de procesamiento de forma individual y en conjunto. Estos resultados indican el nivel de control en la instalación y ayudan a identificar cuándo ocurren fallas o cuándo se requieren intervenciones o acciones adicionales para devolver el proceso con parámetros de control. Sin embargo, lograr un alto nivel de control de procesos ambientales no es una tarea fácil y requiere la cooperación total de toda la organización. Como tal, la preocupación puede extenderse rápidamente por toda una empresa de alimentos cuando se detectan positivos a través de actividades de verificación, especialmente en culturas donde las actividades de seguridad alimentaria son completadas en gran medida por profesionales de la seguridad alimentaria.

La seguridad alimentaria en estas etapas está impulsada por la gestión de crisis, y los líderes enfatizan la importancia de "hacer las cosas bien" mientras realizan investigaciones que no llegan a la raíz del problema. El objetivo principal de cualquier programa de monitoreo será encontrar, corregir y corregir de manera proactiva y transparente. Verificar los problemas antes de que ocurran, y las pruebas positivas son una parte necesaria de ese proceso. Los PMA efectivos, particularmente aquellos vinculados a objetivos específicos como la validación y verificación del saneamiento, pueden reducir significativamente el riesgo de contaminación y retiros asociados. Buenos datos de monitoreo ambiental a menudo son esenciales para permitir que las empresas limiten las retiradas a un solo lote, día de producción o semana de producción. Sin los datos adecuados de validación y verificación, es un desafío probar suficientemente que la contaminación del producto terminado en un día determinado no se pudo haber transferido a lotes posteriores. Además de los peligros para la seguridad alimentaria, los problemas de deterioro (incluidos los problemas causados por organismos introducidos del medio ambiente en las plantas de procesamiento) representan un riesgo comercial creciente para las empresas alimentarias.

Los consumidores a menudo utilizan las plataformas de redes sociales para comunicar problemas relacionados con el deterioro de los alimentos y presionar a las empresas para que actúen. Los retiros del mercado son extremadamente costosos para las empresas y a medida que los sistemas de vigilancia de las enfermedades transmitidas por los alimentos continúan mejorando, las empresas corren un mayor riesgo de ser identificadas como la fuente de un brote. Sin embargo, las empresas alimentarias también han visto que los PMA eficaces pueden facilitar tiempos de ejecución prolongados, mejorando así la eficiencia de la producción. Por ejemplo, el monitoreo ambiental puede identificar áreas difíciles de limpiar que pueden eliminarse mediante el rediseño de equipos, lo que posteriormente permitirá ciclos de producción más largos.

Con un enfoque renovado de la industria en los programas que sustentan el HACCP y una mayor comprensión del importante papel que desempeña el monitoreo ambiental en la entrega de productos seguros a los consumidores, es imperativo que los fabricantes de alimentos consideren los PMA como críticos e inviertan los recursos necesarios para garantizar una ejecución efectiva. Una vez implementados, también es vital que los programas evolucionen con la organización para mejorar continuamente y fomentar una cultura empresarial efectiva y positiva en torno a la seguridad alimentaria.

Del mismo modo, los problemas de contaminación por alérgenos y los retiros de productos a veces pueden rastrearse hasta fallas en los programas de prerrequisitos. Los programas de monitoreo del ambiente y las actividades de muestreo ambiental pueden servir para múltiples propósitos que, a veces, resultan ser complementarios. En la práctica, los programas de monitoreo ambiental suelen abarcar una serie de pruebas -desde el ATP y microorganismos indicadores, hasta patógenos, microorganismos deterioradores y alérgenos- que se llevan a cabo con una variedad de muestras recolectadas en toda una planta en distintos puntos de tiempo y con frecuencias variables.

A menudo, estos programas se han utilizado durante años y se han modificado a lo largo del tiempo para abordar los requisitos específicos de los clientes y regulaciones o problemas o preocupaciones concretos. Esto puede conducir a programas que representan un enfoque descoordinado y carente de unificación, que podría no utilizar los recursos de manera eficaz, en particular si se añaden con frecuencia nuevos requisitos para el monitoreo ambiental. Por lo tanto, a menudo es esencial que la industria alimentaria y las plantas de procesamiento específicas, definan más detalladamente el objetivo de los programas de monitoreo ambiental actuales y planificados. Si bien no parece haber un marco universalmente reconocido para ello, hay algunos posibles enfoques que parecerían lógicos y coherentes con otros aspectos de la gestión de la inocuidad y la calidad de los alimentos, como el HACCP.

Un enfoque basado en el sistema HACCP para desarrollar programas de monitoreo ambiental con fines específicos podría, por ejemplo, comenzar con una identificación de los "peligros" relacionados con la inocuidad y la calidad de los alimentos. Un fabricante de alimentos podría entonces determinar qué peligros específicos podrían transmitirse a través del ambiente de la planta de procesamiento, reconociendo el hecho de que la planta de procesamiento podría ser una fuente o un vehículo de contaminación cruzada, o ambos. Entonces, se indicarían estrategias de control para manejar cada peligro (por ejemplo, saneamiento, BPM, diseño sanitario de equipos); estas representarían el equivalente de los "controles preventivos no relacionados con el proceso".

Posteriormente, una planta podría identificar las actividades de monitoreo ambiental necesarias para validar que un determinado control preventivo no relacionado con el proceso aborde el peligro objetivo (que con frecuencia sería de mucha importancia). A continuación, verificaría la efectividad del control preventivo no relacionado con el proceso validado y se aseguraría de que se aplique de manera consistente. Cabe señalar que la verificación puede incluir mediciones y registros distintos de las pruebas clásicas de monitoreo ambiental. Por ejemplo, las pruebas de ATP (que pueden utilizarse para verificar la limpieza), combinadas con los registros de las mediciones de la concentración de desinfectante y las hojas de verificación que respaldan el tiempo de aplicación del desinfectante podrían ser suficientes para determinar eficiencia y eficacia de cada PMA.

La coordinación e integración de los diferentes aspectos de un programa de monitoreo ambiental puede aumentar la efectividad y la eficiencia del programa. Por ejemplo, en algunas plantas, las pruebas de ATP, las pruebas de alérgenos ambientales y las pruebas microbiológicas ambientales puede que no siempre estén coordinadas y los datos puede que no se analicen en conjunto, a pesar de que todos suelen ayudar a validar o verificar las prácticas de saneamiento. Por consiguiente, los análisis coordinados de las diferentes pruebas pueden permitir una detección rápida y sensible de los problemas de saneamiento. Por ejemplo, los programas coordinados de muestreo ambiental deben incluir el mantenimiento de registros y el análisis de datos de todos los datos de monitoreo ambiental (ATP, microorganismos indicadores, monitoreo de alérgenos y monitoreo de patógenos) y deben incluir una lista estandarizada de puntos de muestreo que abarque todos los lugares analizados.

Las mejores prácticas para los programas de monitoreo ambiental pueden incluir (entre otras cosas) el mantenimiento de registros electrónicos, la selección adecuada de puntos de muestreo (algunas plantas pueden tener miles de puntos de muestreo, todos con un identificador único), el análisis coordinado e integrado de los diferentes datos de monitoreo ambiental, la revisión regular en persona de todos los datos de monitoreo ambiental (normalmente cada seis a doce meses por lo menos), así como otros enfoques para coordinar e integrar los diferentes programas de muestreo ambiental. Entre las estrategias y actividades adicionales que facilitan la coordinación e integración de los programas de monitoreo ambiental, se incluyen el uso de planos de planta y gráficos de tendencias que permiten un análisis temporal y espacial integrado de los diferentes datos de monitoreo ambiental, así como los procedimientos operativos estándar o normales (SOP, Standard Operating Procedures) para la recolección de muestras y seguimiento de los resultados fuera de especificación.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- Adenosín trifosfato (ATP) Molécula de energía presente en cada célula, viva o muerta.
- Muestreo agresivo1 Aumento de la frecuencia y/o el alcance de la toma de muestras en respuesta a un resultado de muestra positivo. También puede incluir la adición de un muestreo posterior al enjuague y otros métodos avanzados de toma de muestras.
- Biopelícula o biofilm Película delgada y viscosa llena de bacterias que se adhiere a una superficie.
- Microbiota Población de microorganismos que se encuentran en un entorno específico.
- Limpieza fuera del sitio (COP, Clean Out- of-Place) Método de limpieza de los elementos de un equipo, los cuales se retiran de su zona de operaciones y se llevan a una estación designada para su desmontaje y limpieza.
- Limpieza en el sitio (CIP, Clean-in-Place) Método de limpieza de las superficies interiores de los equipos, tuberías, recipientes, filtros y accesorios asociados de un proceso sin desmontar.
- Corrección Acción para eliminar una falta de conformidad detectada. Pueden ser actividades inmediatas para identificar y corregir un problema que se produjo durante la elaboración de alimentos, como volver a limpiar y descontaminar una línea antes de iniciar la producción cuando quedan residuos de alimentos después de la limpieza. Esto no debe confundirse con la medida correctiva, ya que puede que no se dirija a la causa del problema.
- Medida correctiva Acción para eliminar la causa de una posible no conformidad o prevenir la ocurrencia de otra situación no deseada No debe confundirse con la corrección, que quizás no aborde la causa, ni con la medida preventiva, que se toma para evitar la aparición de un posible problema.
- Acción correctiva y preventiva (CAPA, Corrective and Preventive Action): Concepto de gestión de calidad que se encuentra en las normas GMP, HACCP e ISO y que tiene como objetivo rectificar una tarea, un proceso, un producto o un comportamiento que ha ocasionado errores o desviaciones del plan previsto.

La CAPA se divide en dos funciones distintas -medidas correctivas y medidas preventivas- para investigar sistemáticamente la causa de los problemas identificados y evitar su repetición o aparición, respectivamente.

- Punto crítico de control (PCC) Punto, paso o procedimiento de un proceso alimentario en el que se puede aplicar un control y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro para la inocuidad alimentaria o reducir el peligro a un nivel aceptable.
- Límite crítico Valor máximo y/o mínimo al que debe controlarse un parámetro biológico, químico o físico en un PCC para prevenir, eliminar o reducir a un nivel aceptable la aparición de un peligro para la inocuidad alimentaria.
- Programa de monitoreo ambiental (EMP, Environmental Monitoring Program o PMA) Programa definido para supervisar el ambiente de una planta de fabricación de alimentos para prevenir la contaminación cruzada del producto terminado con el ambiente.
- Zonas de muestreo de monitoreo ambiental Los programas de muestreo ambiental utilizan una clasificación por zonas para identificar el nivel de riesgo de las áreas o sitios donde el producto puede estar expuesto a la contaminación ambiental luego de un proceso letal microbiano. En la mayoría de los países y regiones, los puntos de muestreo en las plantas de procesamiento se asignan a una de cuatro zonas: La Zona 1 es el área de mayor riesgo que consiste en superficies expuestas de contacto con los alimentos; La Zona 2 contiene superficies de no contacto con los alimentos en estrecha proximidad a los alimentos y superficies de contacto con los alimentos, La Zona 3 contiene superficies de no contacto con los alimentos, más alejadas, ubicadas en el área de procesamiento o cerca de ella; La Zona 4 incluye superficies de no contacto con los alimentos fuera de las áreas de procesamiento. En algunos países, los puntos de muestreo pueden clasificarse en tres zonas, que suelen combinar las Zonas 2 y 3 en una sola.
- Apagafuegos Enfoque que puede resultar a menudo infructuoso, por el cual se intenta repetidamente la misma solución para un problema recurrente en un esfuerzo por lograr el control microbiológico.
- Con causa justificada Muestreo de investigación que sigue a una muestra positiva de un producto, superficie de contacto u otro lugar de verificación.
- Buenas prácticas de manufactura (BPM o GMP, Good Manufacturing Practices): Condiciones y prácticas para la elaboración de alimentos inocuos en condiciones sanitarias, incluido el personal, la planta y los terrenos, las operaciones sanitarias, las instalaciones y los controles sanitarios, los equipos y los utensilios, los procesos y los controles, el almacenamiento y la distribución, y las consideraciones sobre los niveles de acción de los defectos.
- Nicho de crecimiento Lugar que favorece el crecimiento microbiológico y está protegido del proceso de saneamiento; se caracteriza por un alto recuento microbiano después de la limpieza y el saneamiento.
- Sitio de refugio Nicho de crecimiento que contiene el patógeno o su indicador.
- Peligro Cualquier agente biológico, químico (incluido radiológico) o físico que tenga el potencial de causar enfermedades o daño. Los peligros pueden introducirse en los alimentos o estar presentes en ellos de manera natural.

- Análisis de peligros y puntos de control críticos (HACCP, Hazard Analysis and Critical Control Points) Estrategia de inocuidad alimentaria preventiva que consiste en un enfoque sistemático para la identificación y evaluación del nivel de riesgo de los peligros de un determinado alimento, proceso o una práctica de producción de alimentos y el control de tales peligros que tienen una probabilidad razonable de ocurrir.
- Barrera Métodos, procesos, conservadores y tecnologías que se utilizan en combinación para asegurarse de que los patógenos de los productos alimenticios sean eliminados o controlados adecuadamente.
- Identificación de zonas higiénicas División de una planta de fabricación de alimentos en diferentes áreas para evitar los riesgos de contaminación de los alimentos. Las áreas se designan en función del riesgo y pueden incluir áreas donde no hay producción (por ejemplo, oficinas), áreas básicas de GMP (por ejemplo, almacenamiento de materias primas) y el área primordial de control de patógenos (PPCA), donde el producto RTE elaborado se expone al medio ambiente antes de su envasado. Las zonas higiénicas no deben confundirse con las zonas de muestreo de monitoreo ambiental, que se utilizan para designar las áreas objetivo para el muestreo ambiental (es decir, las Zonas 1-4).
- Microorganismo índice Organismo o grupo de organismos cuya presencia está relacionada con la posible aparición de patógenos ecológicamente similares (por ejemplo, Listeria spp.).
- Microorganismo indicador Organismo o grupo de organismos cuya presencia refleja la condición microbiológica general de los alimentos o el medio ambiente (por ejemplo, coliformes, Enterobacteriaceae).
- Intervención Procedimiento con la capacidad de eliminar el patógeno de la zona afectada (por ejemplo, tratamiento térmico, desmontaje completo seguido de limpieza y saneamiento).
- Programa de intervención y control de Listeria Programa de cumplimiento normativo documentado, diseñado para satisfacer las necesidades regulatorias del establecimiento. El programa de intervención y control de Listeria define claramente: (1) las medidas tomadas para verificar la efectividad del control del medio ambiente por parte del establecimiento y (2) las medidas tomadas cuando una muestra del producto, la superficie de contacto o el lugar de verificación da positivo para Listeria monocytogenes o Listeria spp.
- Programa de monitoreo ambiental de patógenos (PEM, Pathogen Environmental Monitoring) Programa definido para supervisar el ambiente de una planta de fabricación de alimentos en busca de microorganismos patógenos. El objetivo de un programa PEM es encontrar y eliminar la contaminación por patógenos en el ambiente de procesamiento. Normalmente, se utilizan para: (1) verificar un sistema general de inocuidad alimentaria (o componentes específicos de un sistema de inocuidad alimentaria) y (2) proporcionar una indicación temprana de los posibles peligros para la inocuidad alimentaria.
- Limpieza y saneamiento profundos y periódicos Desmontaje de los equipos u otros componentes de una planta de procesamiento más allá del nivel normal, seguido de la limpieza y el saneamiento.

- Muestreo posterior al enjuague Muestras que se toman después de la producción, el desmontaje y el enjuague inicial, pero antes de la aplicación de solución de limpieza o desinfectante. Los sitios típicos se encuentran debajo de la línea de productos y en zonas que suelen recibir salpicaduras del proceso de enjuague (por ejemplo, los costados de las máquinas, las patas, la estructura de soporte, la unión entre las paredes con el piso). Las muestras posteriores al enjuague son un buen indicador general de la presencia del microorganismo en el área de producto expuesta luego del proceso letal. La detección del organismo no significa que haya un sitio de refugio dentro del alcance del área muestreada. Las muestras positivas posteriores al enjuague normalmente desencadenan un muestreo agresivo.
- Muestreo preoperatorio Muestras que se toman después del saneamiento, pero antes de iniciar la producción, normalmente durante o después del montaje y la puesta en marcha.
- Acción preventiva Acción para eliminar la causa de una posible no conformidad o prevenir la ocurrencia de otra situación no deseada.
- Controles preventivos (PC, Preventive Control) Medidas de control proactivas, cuyo diseño y ejecución tienen por objeto reducir o eliminar los peligros de inocuidad alimentaria
- Área primordial de control de patógenos (PPCA, Primary Pathogen Control Area): Zona de higiene designada. El PPCA es un área donde el producto está expuesto al ambiente de proceso en una fase post-letal. También se conoce como zona lista para el consumo (RTE, ready-to-eat), zona de alto riesgo o zona de alta higiene.
- Prueba cualitativa Prueba que determina la presencia o ausencia de uno o más analitos en una muestra.
- Prueba cuantitativa Prueba que mide el nivel o la concentración de uno o más analitos en una muestra.
- Unidades relativas de Luz (RLU, Relative Light Unit) Lectura de la cantidad de luz determinada por un sistema individual de control de higiene basado en ATP. Los fabricantes de sistemas ATP pueden tener diferentes valores para una unidad de luz y todas las mediciones se efectúan en relación con ese valor.
- Programa de control del proceso de saneamiento Proceso general con el objetivo de gestionar el monitoreo ambiental; incluye tanto componentes de inocuidad alimentaria como componentes de calidad no regulados por autoridades. Los componentes reglamentarios incluyen HACCP, SSOP, programas de prerrequisitos y programas de control de patógenos. El muestreo de investigación "con causa justificada" es parte del programa de control de patógenos. El muestreo "sin causa justificada" es parte del programa de control del proceso de saneamiento, pero no es necesariamente un componente del programa de cumplimiento normativo.
- Procedimientos operativos estándar de saneamiento (SSOP, Sanitation Standard Operating Procedures) Procedimientos escritos que una planta de fabricación de alimentos desarrolla e implementa para asegurar las condiciones sanitarias y prevenir la contaminación directa o la adulteración de los productos alimenticios. Estos incluyen los pasos escritos para la limpieza y el saneamiento, y se consideran como uno de los programas de prerrequisitos de HACCP.

- Proceso de "búsqueda y destrucción" Enfoque sistemático multifacético para encontrar sitios de microorganismos persistentes (nichos) en las plantas de elaboración de alimentos, con el objetivo de erradicar o mitigar los efectos de tales microorganismos. Este proceso se ha utilizado con eficacia para abordar la contaminación persistente por Listeria monocytogenes en las plantas de elaboración de alimentos. El uso continuo de esta estrategia de base científica no solo puede controlar los patógenos ambientales, sino que también puede utilizarse para controlar la descomposición microbiana en los alimentos listos para el consumo (RTE). El proceso de "búsqueda y destrucción" puede ayudar a:
    - encontrar nichos de crecimiento de patógenos
    - encontrar posibles nichos de crecimiento que requieran monitoreo y control
    - definir el nivel normal de desmontaje
    - definir el nivel de profundidad periódica del desmontaje
    - definir la frecuencia del nivel de profundidad periódica del desmontaje
    - calificar una nueva pieza de equipo (por ejemplo, hacer funcionar durante 90 días y luego llevar a cabo una investigación de "búsqueda y destrucción")
    - validar la efectividad del protocolo de limpieza del equipo
    - validar la efectividad de la intervención aplicada a un equipo (por ejemplo, el tratamiento térmico u otro método)
- Tiempo-Acción-Concentración- Temperatura (TACT, Time-Action-Concentration-Temperature) Enfoque para evaluar la causa de raíz de una falla de un proceso de limpieza mediante la examinación del tiempo, la acción mecánica, la concentración de los productos químicos y/o la temperatura del proceso de intervención.
- Ruta de transferencia Trayectoria que un organismo recorre para desplazarse desde un punto de transferencia a otro (por ejemplo, la trayectoria entre el sitio de refugio y una superficie de contacto o producto); esto refleja normalmente la transferencia de un patógeno por parte de objetos o personas. El agua, empleados, equipos, productos, materiales y aerosoles son vectores de transferencia comunes.
- Punto de transferencia Superficies que están expuestas a limpieza y saneamiento y pueden servir como puntos de contacto que facilitan la transferencia de un microorganismo de una superficie a otra, por ejemplo, las manos enguantadas. Los puntos de transferencia no deben ser nichos de crecimiento cuando se utilizan procedimientos eficaces de limpieza y saneamiento.
- Validación Aportar evidencia científica de que una estrategia controla un peligro determinado. El monitoreo ambiental es una estrategia clave que puede utilizarse para validar los procedimientos de limpieza y saneamiento. Esto suele implicar la realización de pruebas con el equipo, utilizando un enfoque de "búsqueda y destrucción" después de que se haya realizado la limpieza y el saneamiento, incluido el desmontaje completo del equipo y la recolección de muestras en el equipo desmontado para validar que los procedimientos utilizados limpian y desinfectan completamente una pieza del equipo.

- Vectores-Hisopado Hisopados de investigación adicionales que se realizan en todas direcciones, incluso de arriba abajo si es posible, en el lugar de una detección positiva inicial.
- Programa de monitoreo de verificación Programa de rutina para verificar la aplicación consistente del programa de control del proceso de saneamiento; incluye el muestreo ambiental de las Zonas 1, 2 y 3 en el área lista para el consumo (RTE). Este programa se utiliza para el cumplimiento normativo y forma parte del programa HACCP o SSOP de un establecimiento.
- Sitios de verificación, superficie de contacto (Zona 1) Las pruebas de los sitios de la Zona 1 (superficie de contacto con los alimentos) suelen ser la medida de verificación primordial de aplicación consistente del programa de control ambiental de patógenos para prevenir la contaminación del producto. En la fabricación de productos de alto riesgo, estos sitios se deben evaluar semanalmente; las líneas de menor riesgo se pueden evaluar con menor frecuencia, siempre que el proceso esté bajo control.
- Sitios de verificación (Zonas 2 y 3) Lugares muestreados durante las operaciones para detectar la presencia del microorganismo en el entorno operativo normal. Los sitios de verificación son superficies que están expuestas durante las condiciones normales de operación y que probablemente sirvan como puntos de transferencia (es decir, se encuentran en las vías de transferencia). Mediante el monitoreo de los sitios de verificación se detecta el organismo cuando este se traslada desde su lugar de refugio a una superficie de contacto o al producto.
- Zona 1 Superficies de contacto directo con los alimentos después de un proceso letal, por ejemplo, rebanadoras, peladoras, rellenadores, tolvas, cribas, bandas transportadoras, sopladores de aire, manos de los empleados, cuchillos, estantes, mesas de trabajo.
- Zona 2 Superficies de no contacto con los alimentos en estrecha proximidad a los alimentos y superficies de contacto con los alimentos, por ejemplo, el exterior y la estructura de los equipos de procesamiento, las unidades de refrigeración, los paneles de control de los equipos, los interruptores.
- Zona 3 Superficies de no contacto con los alimentos, más alejadas, situadas en la zona de procesamiento o cerca de ella, por ejemplo, montacargas, carretillas de mano, carros, ruedas, cubiertas de retorno de aire, mangueras, paredes, suelos, desagües.
- Zona 4 Superficies de no contacto con los alimentos fuera de las áreas de procesamiento, por ejemplo, vestidores, cafeterías, vías de entrada/acceso, muelles de carga, áreas de almacenamiento de productos terminados, áreas de mantenimiento.

2. Microbiología y metabolismo microbiano

La microbiología, el estudio de los organismos microscópicos, deriva de 3 palabras griegas: mikros (pequeño), bios (vida) y logos (ciencia) que conjuntamente significan el estudio de la vida microscópica. Para mucha gente la palabra microorganismo le trae a la mente un grupo de pequeñas criaturas que no se encuadran en ninguna de las categorías de la pregunta clásica: ¿es animal, vegetal o mineral? Los microorganismos son diminutos seres vivos que individualmente son demasiado pequeños como para verlos a simple vista. En este grupo se incluyen las bacterias, hongos (levaduras y hongos filamentosos), virus, protozoos y algas microscópicas. Normalmente tendemos a asociar a estos pequeños organismos con infecciones, enfermedades como el SIDA, o el deterioro de los alimentos.

Sin embargo, la mayoría de los microorganismos contribuyen de una forma crucial en el bienestar de la Tierra ayudando a mantener el equilibrio de los organismos vivos y productos químicos en nuestro medio ambiente. Los microorganismos del agua dulce y salada son la base de la cadena alimentaria en océanos, lagos y ríos; los microorganismos del suelo destruyen los productos de desecho e incorporan el gas nitrógeno del aire en compuestos orgánicos, así como reciclan los productos químicos en el suelo, agua y aire; ciertas bacterias y algas juegan un papel importante en la fotosíntesis, que es un proceso que genera nutrientes y oxígeno a partir de luz solar y CO_2 siendo un proceso crítico para el mantenimiento de la vida sobre la Tierra; los hombres y algunos animales dependen de las bacterias que habitan en sus intestinos para realizar la digestión y síntesis de algunas vitaminas como son la K y algunas del complejo B.

Los microorganismos también tienen aplicaciones industriales ya que se utilizan en la síntesis de productos químicos como son acetona, ácidos orgánicos, enzimas, alcohol y muchos medicamentos. La industria alimentaria también usa microorganismos en la producción de vinagre, bebidas alcohólicas, aceitunas, mantequilla, queso, yogurt y pan. Además, las bacterias y otros microorganismos ahora pueden ser manipulados para producir sustancias que ellos normalmente no sintetizan.

A través de esta técnica, llamada Ingeniería Genética, las bacterias pueden producir importantes sustancias terapéuticas como insulina, hormona de crecimiento humana e interferón. Actualmente sabemos que los microorganismos se encuentran en todas partes; pero hace poco, antes de la invención del microscopio, los microorganismos eran desconocidos para los científicos.

Miles de personas morían en las epidemias cuyas causas no se conocían. El deterioro de los alimentos no se podía controlar siempre y muchas familias enteras morían debido a que no existían vacunas y antibióticos disponibles para combatir las infecciones. Aunque los microorganismos se originaron hace aproximadamente 4.000 millones de años, la microbiología es relativamente una ciencia joven. Y surgió como ciencia tras el descubrimiento y el perfeccionamiento del microscopio.

El naturalista holandés Antonio van Leeuwenhoek fue el primero en describir, en 1683, estos organismos (a los que bautizó como “animáculos”), que observó con la ayuda de un microscopio construido por él mismo. Ya en 1546 Girolano Fracastoro había sugerido que las enfermedades podían deberse a organismos tan pequeños que no podían verse y que eran transmitidos de una persona a otra. Sin embargo, el descubrimiento de que las bacterias pueden actuar como agentes específicos de las enfermedades infecciosas en los animales fue realizado a través del estudio del carbunco, infección grave de los animales domésticos que es transmisible al hombre. La demostración concluyente de la causa bacteriana o etiología del carbunco la proporcionó en 1876 Roberto Koch, un médico rural alemán.

La demostración concluyente de la causa bacteriana o etiología del carbunco la proporcionó en 1876 Roberto Koch, un médico rural alemán. Koch empezó a estudiar el mundo microbiano después de que su mujer le regalara por su 28 cumpleaños un microscopio. Seis años después Koch anunció al mundo que había encontrado la bacteria del carbunco (*Bacillus anthracis*). Posteriormente él y sus colaboradores descubrieron las bacterias que causan la tuberculosis y el cólera. Esta serie de experimentos se ajustaban a los criterios necesarios para poder establecer la relación causal entre un organismo específico y una enfermedad específica.

Estos criterios se conocen como los **Postulados de Koch**:

- El microorganismo debe estar presente en todos los casos de la enfermedad.
- El microorganismo debe ser aislado del hospedador enfermo y obtenerse en cultivo puro en el laboratorio.
- La enfermedad específica debe reproducirse cuando un cultivo puro del microorganismo se inocula a un hospedador susceptible sano.
- El microorganismo debe ser recuperable de nuevo a partir del hospedador inyectado experimentalmente.

Louis Pasteur fue un químico y biólogo francés que fundó la ciencia de la microbiología. Comenzó investigando los procesos de fermentación del vino y la cerveza y descubrió la existencia de las bacterias que interferían en este proceso. Aplicó sus conclusiones al estudio de la causa y el desarrollo de las enfermedades y demostró la teoría de los gérmenes como causantes de las mismas. También desarrolló vacunas que consiguieron salvar miles de vidas. Pasteur observó que, en la fabricación de la cerveza y el vino, a veces los dos líquidos resultaban buenos y otros agrios.

Decidió estudiar el proceso con el microscopio y descubrió que cuando la fermentación era normal participaban las pequeñas células de la levadura. En cambio, cuando resultaban agrios era porque en el proceso participaban organismos como las bacterias.

A finales del siglo XIX y comienzos del XX, diversos microbiólogos como el ruso Serguei Winogradsky, considerado el fundador de la ecología microbiana moderna, emprendieron las investigaciones sobre el metabolismo de las bacterias (estudios iniciados por Pasteur). Winogradsky estableció que las bacterias funcionan según dos modelos: la aerobiosis, que se basa en el consumo de oxígeno; y la anaerobiosis, que permite a las bacterias vivir en un ambiente desprovisto por completo de oxígeno. Winogradsky descubrió las bacterias quimiosintéticas, puso de manifiesto la participación de los microorganismos en el ciclo de la urea y fue uno de los primeros en estudiar las bacterias simbióticas.

El estudio de los virus se desarrolló especialmente en el primer tercio del siglo XX. En efecto, a pesar de que en el año 1905 varios microbiólogos habían demostrado que las enfermedades víricas conocidas se debían a agentes patógenos minúsculos y no a las toxinas, los virus siguieron siendo invisibles; y su naturaleza, desconocida, hasta la década de 1930. En 1935 el bioquímico estadounidense Wendell Stanley logró aislar y cristalizar el virus del mosaico del tabaco. En 1938 se observaron por primera vez los virus gracias a la invención del microscopio electrónico. Después, en las décadas de 1960 y 1970 se descubrieron numerosos virus y se determinaron sus características físicas y químicas.

Posteriormente, las investigaciones microbiológicas se sirvieron de diversas técnicas innovadoras, como el microscopio electrónico de barrido o las técnicas de secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Gracias a todos estos avances, los microorganismos se clasificaron en función de su estructura molecular, incluyéndolos en dos reinos. De este modo, las bacterias forman el conjunto de los **procariotas**, es decir, organismos en los que el material genético, en forma de ADN, se encuentra libre en el citoplasma y no incluido en un núcleo. Los restantes organismos unicelulares se clasifican como **eucariotas** (en los que el genoma está incluido en el núcleo celular). Entre estos eucariotas unicelulares se distinguen los que pertenecen al reino Protistas (grupo que engloba a los protozoos y algas unicelulares) y los que pertenecen al reino Hongos (las levaduras). Los virus constituyen un mundo aparte, ya que no pueden reproducirse por sí mismos, sino que necesitan parasitar una célula viva para completar su ciclo vital.

Por último, el descubrimiento de los priones por Stanley Prusiner y su equipo en 1982 ha abierto una vía de estudio dentro de la microbiología. Los priones, simples proteínas desprovistas de material genético, suscitan numerosos interrogantes sobre su funcionamiento y modo de transmisión, cuyo ejemplo típico en la EEB (Encefalopatía Espongiforme Bovina) o Mal de la vaca loca. Un método fundamental para estudiar las bacterias es cultivarlas en un medio líquido o en la superficie de un medio sólido de agar.

Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes que van, desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne. Para aislar o purificar una especie bacteriana a partir de una muestra formada por muchos tipos de bacterias, se siembra en un medio de cultivo sólido donde las células que se multiplican no cambian de localización; tras muchos ciclos reproductivos, cada bacteria individual genera por escisión binaria una colonia macroscópica compuesta por decenas de millones de células similares a la original.

Si esta colonia individual se siembra a su vez en un nuevo medio crecerá como cultivo puro de un solo tipo de bacteria. Muchas especies bacterianas son tan parecidas morfológicamente que es imposible diferenciarlas sólo con el uso del microscopio; en este caso, para identificar cada tipo de bacteria, se estudian sus características bioquímicas sembrándolas en medios de cultivo especiales. Así, algunos medios contienen un producto que inhibe el crecimiento de la mayoría de las especies bacterianas, pero no la de un tipo que deseamos averiguar si está presente.

Otras veces el medio de cultivo contiene determinados azúcares especiales que sólo pueden utilizar algunas bacterias. En algunos medios se añaden indicadores de pH que cambian de color cuando uno de los nutrientes del medio es fermentado y se generan catabolitos ácidos. Si las bacterias son capaces de producir fermentación, generan gases que pueden ser apreciados cuando el cultivo se realiza en un tubo cerrado. Con otros medios de cultivo se identifica si las bacterias producen determinadas enzimas que digieren los nutrientes: así, algunas bacterias con enzimas hemolíticas (capaces de romper los glóbulos rojos) producen hemólisis y cambios apreciables macroscópicamente en las placas de agar sangre.

Los diferentes medios y técnicas de cultivo son esenciales en el laboratorio de microbiología de un hospital, pues sirven para identificar las bacterias causantes de las enfermedades infecciosas y los antibióticos a los que son sensibles esas bacterias. Un factor importante a tener en cuenta, es la esterilización, que es un proceso esencial para el tratamiento de higiene en todos los instrumentos quirúrgicos, implantes y muchos otros dispositivos. La desecación y la congelación eliminan muchas especies de bacterias, pero otras simplemente permanecen en estado vegetativo. El calor seco o húmedo elimina todas las bacterias combinando adecuadamente factores como la temperatura a la que se someten y el tiempo de exposición.

Se puede esterilizar por calor seco en estufas a más de 160°C durante media hora, o por calor húmedo en autoclaves a 120°C durante 20 minutos y a presión superior a la atmosférica. La ebullición a 100°C no elimina todos los gérmenes patógenos (entre los que no sólo están incluidos las bacterias sino también virus y levaduras). Otro medio habitual de esterilización, utilizado para objetos no resistentes al calor, son los medios químicos: el ácido fénico, iniciador de la era de la antisepsia, el ácido cianhídrico, el óxido de etileno, la clorhexidina, los derivados mercuriales, los derivados del yodo (especialmente la povidona yodada) y muchas otras sustancias. El alcohol etílico no produce esterilización completa. Otro medio de esterilización actual son las radiaciones ionizantes (beta, gamma).

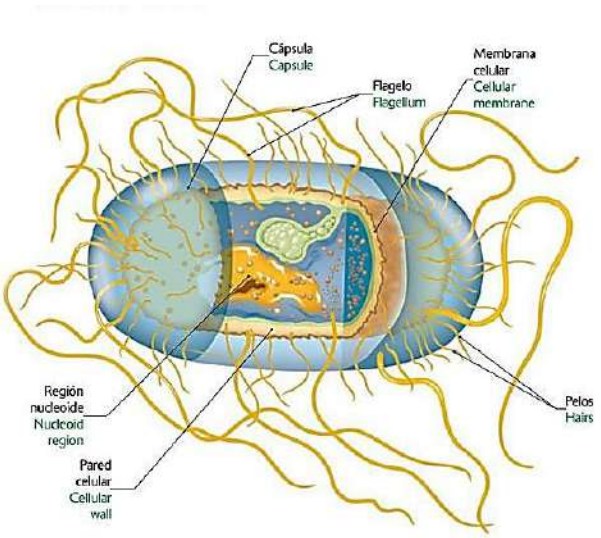
La Pasteurización es un proceso de calentamiento de un líquido, en particular de la leche, hasta una temperatura que oscila entre 55 y 70°C para destruir las bacterias perjudiciales, sin producir cambios materiales en la composición, en el sabor, o en el valor nutritivo del líquido. El proceso se llama así en honor del químico francés Louis Pasteur, quien lo ideó en 1865 con el fin de inhibir la fermentación del vino y de la leche. La leche se pasteuriza al calentarla a 63°C durante 30 minutos, luego se enfría con rapidez, y se envasa a una temperatura de 10°C.

La cerveza y el vino se pasteurizan al ser calentados a unos 60° C durante unos 20 minutos; también se hace, según un método más reciente, calentando a 70° C durante 30 segundos y envasando en condiciones estériles. Los desinfectantes son un arma clave para proteger de los microorganismos ya que estos se encuentran en casi todas partes y por eso los desinfectantes van destruyendo los mismos o impidiendo su desarrollo y asimismo protegen el área donde actúan durante un lapso de tiempo. Basado en los hallazgos del fisiólogo alemán Theodor Schwann y del bioquímico francés Louis Pasteur, Lister desinfectaba las heridas quirúrgicas y accidentales con una solución de ácido carbólico, y en cinco años redujo la tasa de mortalidad de las amputaciones importantes de un 45 por ciento a un 12 por ciento.

Los desinfectantes cumplen un papel muy importante en el campo de la salud ya que si no fuera por estos por una simple herida podrían amputar cualquiera de nuestros miembros. Los antisépticos, son agentes físicos o químicos que evitan la putrefacción, infección o cambios similares, de los alimentos y tejidos vivos, destruyendo los microorganismos o impidiendo su desarrollo. Desde la antigüedad los alimentos se han conservado gracias al empleo de agentes antisépticos como el calor durante la cocción, la sal y el vinagre en la salazón y adobo, y el humo de la madera (que contiene creosota, un compuesto similar al ácido carbólico) en el ahumado de las carnes. En la actualidad, los principales agentes antisépticos en la conservación de los alimentos son el calor y el frío utilizados en procesos como el enlatado, la pasteurización y la refrigeración. La irradiación es otro medio de conservación de los alimentos.

Las bacterias

Una bacteria simplificada está formada por tres capas externas que envuelven las estructuras internas; la capa pegajosa protege la pared celular rígida, que a su vez cubre la membrana celular semipermeable. El flagelo es un medio de locomoción y los pelos que se extienden por fuera de la cápsula ayudan a la bacteria a sujetarse a las superficies. El material genético está contenido en el ADN que forma el nucleoide. Los ribosomas que flotan en el citoplasma intervienen en la síntesis de proteínas. El material genético de la célula bacteriana está formado por una hebra doble de ADN circular.



Muchas bacterias poseen también pequeñas moléculas de ADN circulares llamados plásmidos, que llevan información genética, pero, la mayoría de las veces, no resultan esenciales en la reproducción. Muchos de estos plásmidos pueden transferirse de una bacteria a otra mediante un mecanismo de intercambio genético denominado conjugación.

Otros mecanismos por los cuales la bacteria puede intercambiar información genética son la transducción, en la que se transfiere ADN por virus bacterianos (Bacteriófagos), y la transformación, en la que el ADN pasa al interior de la célula bacteriana directamente desde el medio. Las células bacterianas se dividen por fisión; el material genético se duplica y la bacteria se alarga, se estrecha por la mitad y tiene lugar la división completa formándose dos células hijas idénticas a la célula madre. Así, al igual que ocurre en los organismos superiores, una especie de bacteria origina al reproducirse sólo células de la misma especie. Algunas bacterias se dividen cada cierto tiempo (entre 20 y 40 minutos). En condiciones favorables, si se dividen una vez cada 30 minutos, transcurridas 15 horas, una sola célula habrá dado lugar a unos mil millones de descendientes. Estas agrupaciones, llamadas colonias, son observables a simple vista. En condiciones adversas, algunas bacterias pueden formar esporas, que son formas en estado latente de la célula que permiten a ésta resistir las condiciones extremas de temperatura y humedad.

La clasificación taxonómica más utilizada divide a las bacterias en cuatro grandes grupos según las características de la pared celular. La división **Gracilicutes** incluye a las bacterias con pared celular delgada del tipo Gram negativas; las bacterias de la división **Firmicutes** tienen paredes celulares gruesas del tipo Gram positivas; las de la división **Tenericutes** carecen de pared celular y las de la cuarta división **Mendosicutes** tienen paredes celulares poco comunes, formadas por materiales distintos a los típicos peptidoglucanos bacterianos. Entre las Mendosicutes se encuentran las Arqueobacterias, un grupo de organismos poco comunes, que incluyen a las bacterias metanogénicas, anaerobias estrictas, que producen metano a partir de dióxido de carbono e hidrógeno; a las halobacterias, que necesitan para su crecimiento concentraciones elevadas de sal, y a las termoacidófilas, que necesitan azufre y son muy termófilas. Se ha discutido sobre la conveniencia de que las Arqueobacterias se incluyeran en un reino aparte, ya que estudios bioquímicos recientes han mostrado que son tan diferentes de las otras bacterias como de los organismos eucariotas (con núcleo diferenciado englobado en una membrana). Estos cuatro grandes grupos de bacterias se subdividen además en unas 30 secciones numeradas, alguna de las cuales se dividen a su vez en órdenes, familias y géneros.

Los hongos

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Éstas a menudo están divididas por tabiques llamados septos. En cada hifa hay uno o dos núcleos y el protoplasma se mueve a través de un diminuto poro que ostenta el centro de cada septo. No obstante, hay un filo de hongos, que se asemejan a algas, cuyas hifas generalmente no tienen septos y los numerosos núcleos están esparcidos por todo el protoplasma. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas, resultante de este crecimiento, se llama micelio. Cuando el micelio se desarrolla puede llegar a formar grandes cuerpos fructíferos, tales como las setas. Otros tipos de enormes estructuras de hifas permiten a algunos hongos sobrevivir en condiciones difíciles o ampliar sus fuentes nutricionales. Las fibras, a modo de cuerdas, del micelio de la armilaria color de miel (*Armilaria melea*), facilitan la propagación de esta especie de un árbol a otro.

Ciertos hongos forman masas de micelio resistentes, con forma más o menos esférica, llamadas esclerocios. Éstos pueden ser pequeños como granos de arena, o grandes como melones. La mayoría de los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular. El champiñón silvestre puede formar doce mil millones de esporas en su cuerpo fructífero; así mismo, el cuesco de lobo gigante puede producir varios billones.

Las esporas se forman de dos maneras. En el primer proceso, las esporas se originan después de la unión de dos o más núcleos, lo que ocurre dentro de una o de varias células especializadas. Estas esporas, que tienen características diferentes, heredadas de las distintas combinaciones de genes de sus progenitores, suelen germinar en el interior de las hifas. Los cuatro tipos de esporas que se producen de esta manera (oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas) definen los cuatro grupos principales de hongos.

Las oosporas se forman por la unión de una célula macho y otra hembra; las zigosporas se forman al combinarse dos células sexuales similares entre sí. Las ascosporas, que suelen disponerse en grupos de ocho unidades, están contenidas en unas bolsas llamadas ascas. Las basidiosporas, por su parte, se reúnen en conjuntos de cuatro unidades, dentro de unas estructuras con forma de maza llamadas basidios.

A pesar de que en muchos textos se emplean sistemas de clasificación relativamente complicados, los micólogos utilizan por lo común un sistema sencillo, que tiene la ventaja de ser cómodo de usar. Según este sistema, los cuatro filos principales son: Oomicetes, Zigomicetes, Ascomicetes y Basidiomicetes y sus respectivos individuos forman oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas. Una gran variedad de especies se coloca, de forma arbitraria, en un quinto filo: Deuteromicetes, también llamados hongos imperfectos. Se incluyen en este grupo aquellos hongos en los que sólo se conocen procesos de multiplicación vegetativa. Sin embargo, la mayoría de esas especies están emparentadas con los ascomicetes.

Microbiología y alimentos

Hay varios mecanismos empleados para proteger a los alimentos contra los microorganismos y otros agentes responsables de su deterioro para permitir su futuro consumo. Los alimentos en conserva deben mantener un aspecto, sabor y textura apetitosos, así como su valor nutritivo original. Hay muchos agentes que pueden destruir las peculiaridades sanas de la comida fresca. Los microorganismos, como las bacterias y los hongos, estropean los alimentos con rapidez. Las enzimas, que están presentes en todos los alimentos frescos, son sustancias catalizadoras que favorecen la degradación y los cambios químicos que afectan, en especial, la textura y el sabor.

El oxígeno atmosférico puede reaccionar con componentes de los alimentos, que se pueden volver rancios o cambiar su color natural. No hay ningún método de conservación que ofrezca protección frente a todos los riesgos posibles durante un periodo ilimitado de tiempo. Los alimentos enlatados almacenados en la Antártida cerca del polo sur, por ejemplo, seguían siendo comestibles al cabo de 50 años, pero esta conservación a largo plazo no puede producirse en el cálido clima de los trópicos. Además del enlatado y la congelación, existen otros métodos tradicionales de conservación como el secado, la salazón y el ahumado. La desecación por congelación o liofilización es un método más reciente. Entre las nuevas técnicas experimentales se encuentran el uso de antibióticos y la exposición de los alimentos a la radiación nuclear. La congelación conserva los alimentos impidiendo la multiplicación de los microorganismos. Dado que el proceso no destruye a todos los tipos de bacterias, aquellos que sobreviven se reaniman en la comida al descongelarse y a menudo se multiplican mucho más rápido que antes de la congelación.

La congelación impide la multiplicación de los microorganismos (bacterias y hongos microscópicos). Por el contrario, las enzimas, cuya actividad degrada los alimentos, sí se mantienen activas en condiciones de congelación, aunque su actividad es mucho más lenta. Por eso las legumbres frescas suelen blanquearse o hervirse antes de congelarlas, con el fin de inactivar estas sustancias e impedir que el sabor se degrade. También se ha propuesto blanquear el pescado para destruir las bacterias resistentes al frío que viven en las escamas. Los métodos de congelación de los productos cárnicos dependen del tipo de carne y del corte.

El cerdo, por ejemplo, se congela justo después del sacrificio, mientras que el buey se cuelga durante varios días dentro de una cámara fría para hacerlo más tierno. Existen una serie de características que comparten todos los microorganismos y que suponen ciertas ventajas para su uso en la industria. la más fundamental, el pequeño tamaño de la célula microbiana y su correspondiente alta relación de superficie a volumen. Esto facilita el rápido transporte de nutrientes al interior de la célula y permite, por consiguiente, una elevada tasa metabólica. Así, la tasa de producción de proteína en las levaduras es varios órdenes de magnitud superior que, en la planta de soja, que, a su vez, es 10 veces más alta que en el ganado.

Esta velocidad de biosíntesis microbiana extremadamente alta permite que algunos microorganismos se reproduzcan en tan solo 20 minutos (*Escherichia coli*). Los ambientes capaces de albergar vida microbiana son muy variados. Se han encontrado especies que viven a temperaturas comprendidas entre el punto de congelación del agua y el punto de ebullición, en agua salada y dulce, en presencia y en ausencia de aire. Algunos han desarrollado ciclos de vida que incluyen una fase de latencia en respuesta a la falta de nutrientes: en forma de esporas permanecen inactivos durante años hasta que el medio ambiente, más favorable, permita el desarrollo de las células. Los microorganismos se hallan capacitados para acometer una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse así a muchas fuentes de nutrición. Versatilidad que hace posible el que las fermentaciones industriales se basen en nutrientes baratos.

Un microorganismo de uso industrial debe producir la sustancia de interés; debe estar disponible en cultivo puro; debe ser genéticamente estable y debe crecer en cultivos a gran escala. Otra característica importante es que el microorganismo industrial crezca rápidamente y produzca el producto deseado en un corto período de tiempo. El microorganismo debe también crecer en un relativamente barato medio de cultivo disponible en grandes cantidades. Además, un microorganismo industrial no debe ser patógeno para el hombre o para los animales o plantas. Un requisito importante es la facilidad de separar las células microbianas del medio de cultivo; la centrifugación es dificultosa o cara a gran escala. Los microorganismos industriales más favorables para esto son aquellos de mayor tamaño celular (hongos filamentosos, levaduras y bacterias filamentosas) ya que estas células sedimentan más fácilmente que las bacterias unicelulares e incluso son más fáciles de filtrar.

Los microorganismos que sintetizan productos útiles para el hombre representan, como máximo, unos pocos centenares de especies de entre las más de 100.000 descriptas en la Naturaleza. Los pocos que se han encontrado con utilidad industrial son apreciados por elaborar alguna sustancia que no se puede obtener de manera fácil o barata por otros métodos. Las levaduras se vienen utilizando desde hace miles de años para la fabricación de pan y bebidas alcohólicas. La levadura que sin duda fue la primera y aún hoy en día sigue siendo la más utilizada por el hombre es *Saccharomyces cerevisiae* de la que se emplean diferentes cepas para la fabricación de cerveza, vino, sake, pan y alcoholes industriales.

Kluyveromyces fragilis es una especie fermentadora de la lactosa que se explota en pequeña escala para la producción de alcohol a partir del suero de la leche. *Yarrowia lipolytica* es una fuente industrial de ácido cítrico. *Trichosporum cutaneum* desempeña un importante papel en los sistemas de digestión aeróbica de aguas residuales debido a su enorme capacidad de oxidación de compuestos orgánicos, incluidos algunos que son tóxicos para otras levaduras y hongos, como los derivados fenólicos. Los hongos tienen una gran importancia económica, no tan sólo por su utilidad, sino también por el daño que pueden causar. Los hongos son responsables de la degradación de gran parte de la materia orgánica de la Tierra, una actividad enormemente beneficiosa ya que permite el reciclaje de la materia viva. Por otro lado, los hongos causan gran cantidad de enfermedades en plantas y animales y pueden destruir alimentos y materiales de los que depende el hombre. Los efectos perjudiciales de los hongos están contrarrestados por su utilización industrial.

Los hongos son la base de muchas fermentaciones como la combinación de soja, habichuelas, arroz y cebada que dan lugar a los alimentos orientales: miso, shoyu y tempeh. Los hongos son también la fuente de muchas enzimas comerciales (amilasas, proteasas, pectinasas), ácidos orgánicos (cítrico, láctico), antibióticos (penicilina), quesos especiales (Camembert, Roquefort) y, evidentemente, de las setas.

En contra de la idea de que todos los microorganismos son dañinos, los yogures y los quesos son ejemplos de alimentos a los que se añaden éstos para, por ejemplo, agriar la leche y producir yogur, u obtener la cubierta blanca característica del queso Brie o el color azul del queso Roquefort. De un tamaño más o menos similar es el sector de frutas y verduras, en el que los productos pueden no haber sufrido ninguna alteración o estar enlatados, congelados, refrigerados o fritos. Actualmente, existen muchos otros productos químicos que se obtienen por fermentación (un término técnicamente restringido a los procesos que ocurren en ausencia de aire, como la producción de alcohol por levaduras, aunque este término a menudo se utiliza de forma más amplia). Estos productos incluyen el ácido oxálico utilizado en tintes y colorantes, el ácido propenoico (ácido acrílico) utilizado como intermediario en la producción de plásticos, o el ácido láctico empleado para acidificar alimentos y como anticongelante.

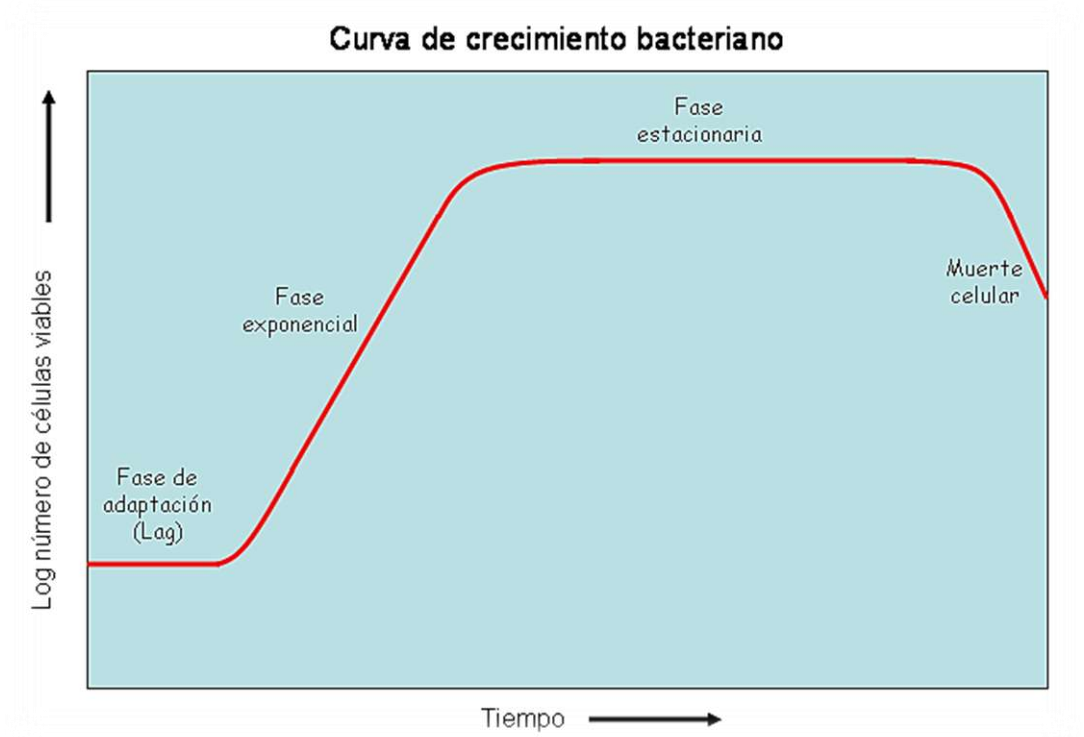
Los microorganismos se han usado, así mismo, en la obtención de diferentes enzimas utilizadas para aplicaciones tan diversas, como la eliminación de manchas en los tejidos (gracias a la incorporación de enzimas en los detergentes que atacan proteínas y ácidos grasos), o la conversión de harina de maíz en sirope (utilizado para endulzar refrescos, galletas y pasteles).

Ecología microbiana

Las bacterias que pueden presentarse en el agua de consumo y en los alimentos crudos y/o cocidos, son microorganismos de una organización celular simple y se encuentran solos o agrupados; constan de una pared rígida que además de otorgar una forma característica para cada familia bacteriana, le permitirá a las mismas colorearse o no con determinadas substancias que nos orientarán a priori sobre qué género de bacteria está contaminando la muestra. Dichos contaminantes, bajo condiciones favorables de pH, temperatura y nutrientes, desarrollan un crecimiento explosivo.

Amplios grupos de microorganismos, desarrollan en estrechos rangos de pH que van entre los 6,60 a los 7,50 como valores extremos promedio, excepto los mohos y levaduras que prácticamente abarcan la escala de 0 a 14. Un alimento tiene una composición microbiana constante, únicamente cuando ha intervenido un factor externo (congelación o deshidratación) o cuando se han agotado todos los elementos nutritivos o, una vez que, la acumulación de productos metabólicos finales ha llegado a un nivel que determina la inhibición de todo crecimiento. Hasta que se llega a la etapa de estabilización, la composición cualitativa y cuantitativa de la microflora está cambiando constantemente. Cada alimento tiene, en un momento dado, un perfil microbiano característico, comenzando por la "flora inicial", correspondiente a la recolección o sacrificio, que va aumentando a lo largo del transporte, elaboración y almacenamiento.

El microambiente específico de cada alimento, en particular y, las acciones estimuladoras o inhibidoras, que ejercen unos microorganismos sobre otros, influirán en el resultado final. Existen ciertas condiciones que favorecen el desarrollo de microfloras específicas e inhiben la presencia de otras; estas condiciones se traducen en **factores intrínsecos, de elaboración y extrínsecos.** Las bacterias responsables de las enfermedades transmitidas por los alimentos tienen una temperatura óptima de crecimiento de 37º C. Pese a todo, pueden crecer a una velocidad considerable en un rango de temperatura que se halla entre los 5º C Y 65º C. Fuera de este rango su capacidad reproductora se ve muy disminuida. A 100º C (ebullición) las bacterias comienzan a morir y por debajo de 5º C (refrigeración) su crecimiento es más lento; a los 0° C (congelación) quedan en estado latente pero no mueren.



- ✓ Los psicrótrofos: crecen a Tª de refrigeración (- 5° C) y a óptimas de 20 – 30° C (*Cl. botulinum*).
- ✓ Los psicrófilos crecen a Tª de refrigeración con óptimas de 10 – 15° C (*Listeria sp*).
- ✓ Los mesófilos crecen entre los 30 y 40ºC (*Enterobacterias*).
- ✓ Los termótrofos crecen entre 42 y 50° C (*Escherichia coli*).
- ✓ Los termófilos crecen entre 50 y 90° C (*Bacilo estearotermófilo*).

Las bacterias como todos los seres vivos, necesitan alimentarse para poder desarrollarse. Prefieren alimentos con un alto contenido de proteínas y humedad tales como carnes rojas, pollos, pescados o productos lácteos. La humedad del agua en algunos alimentos va de fuera a dentro o al revés. Si la humedad relativa atmosférica es igual a la del alimento se conserva inalterado. Si la humedad relativa del alimento es **<** que la humedad relativa atmosférica el alimento se seca (EJ: Jamón de York o Jamón cocido).

Si la humedad relativa atmosférica es **>** que la humedad relativa del alimento: se humedece el alimento y pueden crecen hongos (galletas, pan). Para preservar la contaminación de los alimentos; guardar bajo condiciones ambientales restrictivas. Cuando se almacenan bajo condiciones restrictivas se retrasa el deterioro del alimento al reducirse el crecimiento microbiano.

Los factores **intrínsecos** son inherentes a los alimentos e influyen en el crecimiento microbiano. Corresponden a características químicas, físicas y bioquímicas (nutrientes, factores antimicrobianos naturales, pH, Aw y Eh). Sus efectos combinados determinaran la selección de la porción de la flora inicial capaz de sobrevivir o crecer; los microorganismos que no pueden competir en ese ambiente, son eliminados gradualmente. Por ejemplo, la mayor parte de las bacterias gram-negativas, que originalmente se encuentran en gran cantidad en las plantaciones, no sobreviven en los frutos cítricos, debido al pH claramente desfavorable. Por lo tanto, su alteración está producida por mohos, levaduras o microorganismos gram positivos, que únicamente se encontraban, en la flora inicial, en proporciones menores. Los nutrientes se han de encontrar en forma que puedan ser utilizables o degradables por los microorganismos. Algunas estructuras son resistentes al ataque microbiano y solamente pueden ser degradadas por microorganismos con enzimas específicos.

La mayoría de los microorganismos alterativos no son exigentes en cuanto a sus nutrientes. Se ha venido considerando que, la alteración de los alimentos ricos en proteínas es el resultado del ataque de las enzimas bacterianas proteolíticos, que liberan aminas y péptidos de bajo peso molecular; pero actualmente se sabe que, el desarrollo microbiano en carne conservada en condiciones aeróbicas, no da lugar a una descomposición proteica significativa, hasta que no se alcanza un avanzado estado de alteración. El crecimiento bacteriano inicial se produce a expensas de la glucosa y ribosa y, continúa utilizando los lactatos y aminoácidos.

Únicamente, ciertos grupos de microorganismos especiales tienen un potencial enzimático suficiente para atacar estructuras biológicas complejas y dar lugar a alteraciones. Por ejemplo, los estados de degradación iniciales de muchos tejidos vegetales, sólo pueden ser producidos por microorganismos que segregan celulasas o pectinasas. Estas enzimas despolimerizan los polisacáridos de la pared celular y liberan compuestos metabolizables de peso molecular bajo, que pueden ser utilizados por otros microorganismos. Ciertas proteínas (queratina o elastina) son muy resistentes a la degradación por enzimas microbianas. Otras, como el colágeno, son descompuestas por la colagenasa, que sólo la producen muy pocos microorganismos *(Pseudomonas sp, Clostridium perfringens* y otros clostridios patógenos).

Las proteínas y péptidos solubles se degradan mucho más fácilmente. Como resultado de este proceso de degradación se puede llegar a establecer un patrón particular de aminoácidos libres. Una vez que las proteínas han sido fragmentadas por la flora proteolítica, en elementos de peso molecular bajo, estos son fácilmente utilizados por la flora restante.

Algunas especies liberan aminoácidos, que pueden ser asimilados por otros microorganismos, de tal modo que, llegan a establecerse asociaciones de dependencia. Otros producen péptidos de carácter estimulante. Por ejemplo, *Streptococcus thermophilus* da lugar, en el yogur, a péptidos, que utiliza Lactobacillus bulgaricus. Muchos microorganismos alterativos (*Pseudomonas y Bacillus sp*), así como la mayor parte de los mohos y algunas levaduras y enterobacterias producen enzimas lipolíticas, que hidrolizan las grasas. La proteólisis y glucólisis son actividades metabólicas esenciales de muchos organismos alterativos, mientras que, la lipólisis es menos frecuente. Existen dos razones que avalan esta idea. Primera, la proteólisis y glucólisis se llevan a cabo mucho más rápidamente, porque los sustratos de proteínas y carbohidratos son, casi siempre, solubles y, por lo tanto, más fácilmente accesibles a los enzimas microbianos intra y extracelulares. Segunda, las grasas son relativamente insolubles, por lo que las porciones directamente accesibles a los enzimas extracelulares de los microorganismos alterativos son generalmente muy pequeñas, estando inicialmente limitadas a la superficie de la monocapa de las partículas grasas. En algunas emulsiones alimentarias "agua en aceite", la distribución de los microorganismos en las gotitas grasas aisladas está hecha de tal forma que, la mayor parte del lípido no es accesible a los enzimas microbianos.

De hecho, el deterioro oxidativo de las grasas está originado principalmente por factores físicos y químicos, siendo raro el enranciamiento microbiano. No obstante, la lipólisis lenta, efectuada por los microorganismos, contribuye a la obtención de los típicos sabores de ciertos quesos (Roquefort, Gorgonzola) y de algunos productos cárnicos desecados y fermentados de forma natural, como el salame. La actividad lipásica es importante, en relación con las modificaciones del sabor, sólo como una primera etapa de una serie de reacciones. No existe correlación entre la producción de lipasas y la actividad oxidativa de los microorganismos.

El contenido vitamínico de los alimentos no constituye un factor importante que pueda influir en la presentación de alteraciones, por lo que la pérdida de vitaminas en los alimentos, raramente, evita o retrasa su deterioro. No obstante, existen excepciones. Así, en los huevos los mecanismos antimicrobianos incluyen la unión de la biotina a la avidina, que disminuye la capacidad alterativa de los microorganismos. Todos los alimentos contienen minerales en cantidades excesivas, en relación con los que los microorganismos requieren para su crecimiento.

En sustratos totalmente exentos de minerales no es posible el crecimiento de microorganismos y los zumos de frutas, completamente desmineralizados por intercambio iónico, son más resistentes a las levaduras que los productos no tratados. Ciertos alimentos contienen constituyentes microbianos; estos constituyentes se han encontrado en algunos tejidos vegetales, como especias, cebollas, ajos, berros y perejil, así como frutas (uvas). Las frambuesas contienen ácido salicílico, las bayas del fresno, ácido sórbico, y los frutos cítricos, aceites antibacterianos. Existen actividades antimicrobianas en alimentos de origen animal, sobre todo en la sangre (complemento, properdina, lisozima, histona, protamina y hematina).

El calostro, leche, saliva, leucocitos y algunos otros fluidos y tejidos tienen un sistema antimicrobiano eficaz, en el que la peroxidasa (lactoperoxidasa de la leche) cataliza la peroxidación de sustancias de bajo peso molecular (como el tiocianato) para formar productos que inactivan a los microorganismos. Los huevos de gallina contienen lisozima, que lisa ciertas clases de bacterias. El crecimiento y multiplicación de los microorganismos están influidos por la estructura o estado físico de los alimentos; por ejemplo, el estado líquido o congelado del agua tisular, la distribución de la fase acuosa de las emulsiones y la presencia de barreras biológicas (cáscara y membranas de los huevos, escamas del pescado y piel de las aves). La actividad antimicrobiana de las enzimas tisulares se reduce o, incluso se destruye, por tratamiento térmico. La congelación puede liberar importantes cantidades de lisozima de los tejidos animales e inhibir el crecimiento de los microorganismos, utilizados para detectar residuos de antibióticos u otras sustancias inhibidoras, en la inspección de carnes. En consecuencia, se pueden obtener resultados positivos falsos. En la mayor parte de los casos, sus efectos quedan limitados a determinados grupos de microorganismos. Algunos componentes pueden anular los efectos de otros.

En este sentido, ciertos cationes divalentes contrarrestan los efectos inhibidores de los ácidos grasos de cadena larga. Todos los factores que influyen en la colonización, supervivencia y crecimiento microbiano durante la preparación de los alimentos, se denominan **factores de elaboración**. Estos factores pueden inhibir o, incluso destruir, parte o la totalidad de la población. Por otro lado, los componentes individuales de la flora están, en ciertos aspectos, de tal modo favorecido que producen cambios en el perfil microbiológico. Los **factores extrínsecos**, están representados por factores ambientales, como temperatura de almacenamiento, presión de vapor del agua y presiones parciales de los gases de almacenamiento, que seleccionan una flora particular.

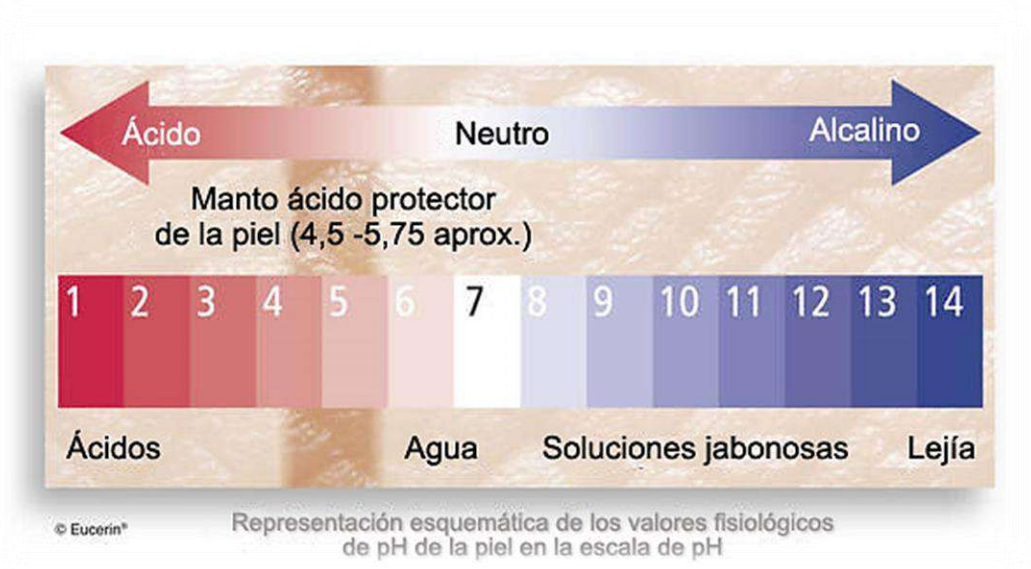
pH

El desarrollo microbiano determina la alteración o la enfermedad de origen alimentario que es, a su vez, una combinación de factores intrínsecos, de elaboración y extrínsecos, que son independientes. En estado natural, la mayoría de los alimentos, como carnes, pescados y productos vegetales, son ligeramente ácidos. La mayor parte de las frutas son bastante ácidas y solo algunos alimentos, como la clara de huevo, por ejemplo, son alcalinos. Para preservar los alimentos, durante miles de años se ha venido aumentando su acidez, bien de manera natural, por fermentación, o artificial, por adición de ácidos débiles, con lo que se consigue inhibir la proliferación microbiana.

La acidez puede ser un factor básico en la preservación. como en el caso de algunos alimentos fermentados tales como el yogur, la col fermentada o los pepinillos en vinagre, o tener un papel auxiliar, cuyo efecto se combina con el de otros factores tales como conservadores químicos, calor o actividad de agua (Aw). El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante el procesado, el almacenaje y la distribución.

Como el efecto de algunos otros factores, de los que se habla en este volumen, depende en parte del pH y es a veces difícil separar el efecto del pH per se y el de otros factores influidos por el pH. Así, por ejemplo, los microorganismos se ven afectados por el nivel de iones H^+ libres (o sea, el pH per se) y, además, por la concentración de ácido débil no disociado, la cual a su vez depende del pH.

El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante el procesado, el almacenaje y la distribución. Como el efecto de algunos otros factores, de los que se habla en este volumen, depende en parte del pH y es a veces difícil separar el efecto del pH per se y el de otros factores influidos por el pH. Así, por ejemplo, los microorganismos se ven afectados por el nivel de iones H^+ libres (o sea, el pH per se) y, además, por la concentración de ácido débil no disociado, la cual a su vez depende del pH.
Las características físicas del producto determinan cual ha de ser en cada caso el procedimiento más adecuado para preparar la muestra y medir su pH. Para alimentos líquidos o semilíquidos de consistencia homogénea, basta con sumergir en la muestra el extremo del electrodo y asegurarse de que el contacto sea completo.



Representación esquemática de los valores fisiológicos de pH de la piel en la escala de pH

Los alimentos que contienen partículas sólidas han de ser homogeneizados antes de tomar la muestra, para poder medir el pH global. Algunos alimentos no son homogéneos y presentan gradientes de pH entre la superficie y el centro de la pieza o partícula (es el caso, por ejemplo, de algunos productos vegetales durante el proceso de encurtido). Las diferencias de pH en distintos puntos de la muestra son reflejo de su naturaleza y tamaño. Para medir el pH de una superficie húmeda (como la de filetes de carne o pescado, por ejemplo) basta con aplicar los dos electrodos con suficiente presión como para obtener una lectura en el pHmetro; la medida corresponde al pH existente en la superficie del electrodo de vidrio, mientras que el electrodo de calomelano sirve sólo para establecer contacto eléctrico. En determinadas circunstancias, por ejemplo, cuando se trata de alimentos muy ácidos o fuertemente tamponados, el título de la acidez puede ser más útil que el empleo del pHmetro.

Una proporción sustancial del ácido débil en solución se encuentra en forma no disociada, por lo que no contribuye directamente al pH, que sólo indica concentración de protones, no concentración total de ácido. Existen dos tipos de conservadores ácidos:

- Los ácidos fuertes (como el clorhídrico o el fosfórico), cuyo efecto consiste en bajar considerablemente el pH, proporcionando una concentración externa de protones muy elevada, que determina la acidificación del medio interno celular. Tales condiciones son normalmente inaceptables en alimentos, pero permisibles en bebidas carbónicas, en las que se emplea el ácido fosfórico como acidulante.
- Los ácidos débiles lipofílicos, que provocan la entrada de protones a través de la membrana celular, acidificando el interior de la célula e inhibiendo el transporte de nutrientes.

Algunos ácidos se disocian dando lugar a aniones (lactato o citrato, por ejemplo) que la célula es capaz de transportar y cuya presencia por tanto no inhibe el metabolismo energético. Otros ácidos, como el acético o el fórmico, son eficaces conservadores debido a que no sólo son buenos conductores de protones, sino que además pueden dar lugar a concentraciones intracelulares de sus aniones que ejercen acción inhibitoria.

Los iones potenciadores de ácidos, tales como el sulfito o el nitrito (las sales de ácidos minerales débiles), que resultan altamente inhibitorios a pH bajo. Las células de diferentes especies microbianas muestran muy distinta tolerancia a la acidificación interna o a la acumulación de aniones y sus membranas presentan distintas características en cuanto a permeabilidad de ácidos lipofílicos. A partir de una flora mixta, la acidez puede actuar como agente selector de un componente de la población inicial que sea particularmente tolerante. Las levaduras y los lactobacilos resultan a menudo seleccionados por efecto de los pH bajos.

Aw (Actividad de agua)

Los microorganismos, asimismo, requieren la presencia de agua, en una forma disponible, para que puedan crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas. La mejor forma de medir la disponibilidad de agua es mediante la actividad de agua (Aw o aw). La aw de un alimento puede reducirse aumentando la concentración de solutos en la fase acuosa de los alimentos mediante la extracción del agua o mediante la adición de solutos. Algunas moléculas del agua se orientan en tomo a las moléculas del soluto y otras quedan absorbidas por los componentes insolubles de los alimentos. En ambos casos, el agua queda en una forma que es menos reactiva. La deshidratación es un método de conservación de los alimentos basado en la reducción de la aw, lo que se consigue eliminando el agua de los productos. Durante el curado y salazonado, así como en el almíbar y otros alimentos azucarados son los solutos los que, al ser añadidos, descienden la aw.

Un pequeño descenso de la aw es a menudo suficiente para evitar la alteración de los alimentos siempre que esta reducción sea potenciada por otros agentes tal como ocurre con los nitritos en muchas carnes curadas y con los componentes del humo en los alimentos ahumados, salazonados y desecados. La aw de un alimento o solución se define como la relación entre la presión de vapor del agua del alimento (p) y la del agua pura (po) a la misma temperatura. A medida que una solución se concentra. la presión de vapor disminuye y la aw va descendiendo a partir de un valor máximo de 1 para el agua pura (en ausencia de capilares o fuerzas de adsorción). La aw está relacionada con el punto de congelación y con el de ebullición, así como con la humedad relativa en equilibrio (ERH) y la presión osmótica. Los datos ofrecidos anteriormente permiten predecir la aw de una solución sencilla de composición conocida pero la relación entre la composición de un alimento y su aw es mucho más compleja. Para conocer estas relaciones lo habitual es determinar los valores de la aw del alimento a diferentes concentraciones de agua, los que se representan gráficamente con el fin de obtener la isoterma de absorción de agua.

Los factores que reducen la presión de vapor de agua en los alimentos y, por tanto, la aw son los siguientes: la adsorción de las moléculas de agua a las superficies, las fuerzas capilares y las sustancias disueltas que se han mencionado anteriormente. Normalmente se acepta que la primera subida de la isoterma representa la adsorción del agua que forma una monocapa de moléculas en los lugares de adsorción del producto sólido. Al añadir más agua, la isoterma aumenta rápidamente de nuevo a medida que los solutos se disuelven y se llenan los espacios capilares. Estos fenómenos se solapan y algunos, realmente, pueden no estar representados en la isoterma. En estos casos puede no evidenciarse la monocapa en los alimentos que contengan poco material estructural al mismo tiempo que las fuerzas capilares pueden tener poca influencia. Para muchos alimentos, la isoterma obtenida por adsorción de agua a un producto seco difiere de la hallada secando un alimento húmedo. Este efecto se denomina histéresis y la parte divergente de las isotermas se le llama "espacio" de histéresis.

En la práctica, la mayoría de los alimentos con una baja aw se preparan por desorción del agua, es decir, deshidratándolos. Por ello, la isoterma de desorción es la más importante y la histéresis no presenta problema alguno. Sin embargo, la situación puede ser más complicada cuando se formulan ciertos alimentos, los que poseen un grado de humedad intermedio (aw = 0,60 - 0,90) en los que se mezclan ingredientes con valores de aw distintos. En los alimentos que muestran un marcado grado de histéresis a altos niveles de aw, los microorganismos pueden crecer más rápidamente, a iguales aw, en los sistemas ajustados por desorción que en aquellos preparados por un proceso de adsorción. La actividad de agua depende de la temperatura dado que ésta influye también sobre la presión de vapor de agua de las soluciones, pero el efecto es pequeño con la mayoría de los solutos salvo que las soluciones sean saturadas. En tales casos, las cantidades de algunas sustancias de la solución, y por tanto la aw, pueden variar marcadamente con la temperatura. A temperaturas inferiores a las del punto de congelación de una solución o alimento, la presión de vapor del agua líquida disminuye al descender la temperatura. La aw de una solución o alimento congelados es función de la temperatura presentando un valor de 0,953 a -5ºC; de 0,907 a -10ºC; de 0,864 a -15ºC y de 0,823 a -20ºC.

T° (Temperatura)

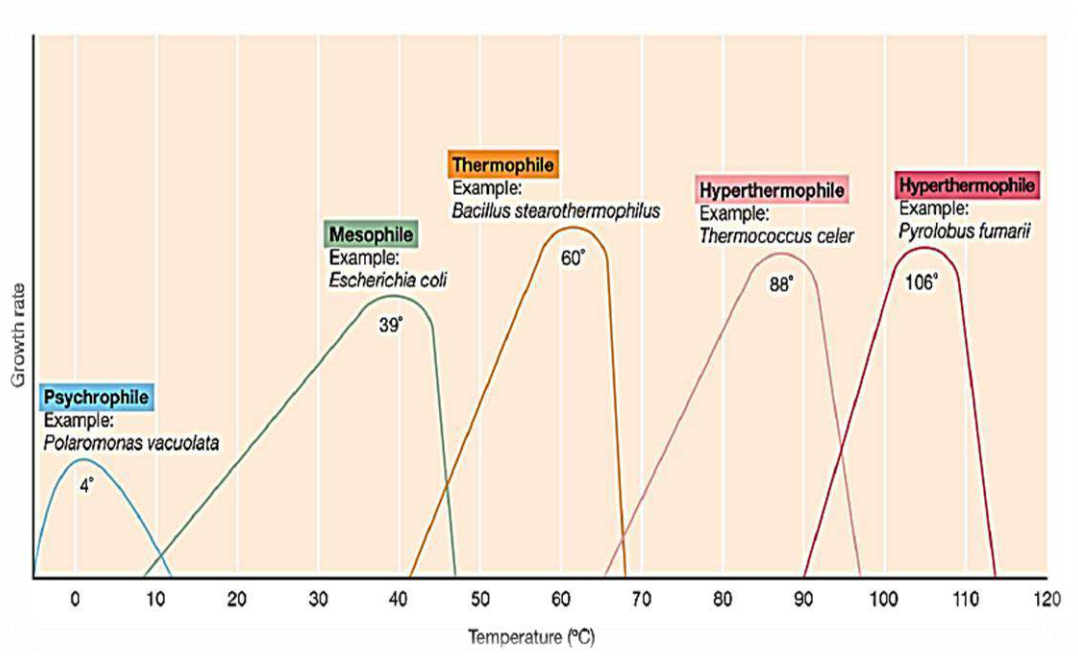
El hombre ha aprendido a lo largo de los siglos, por vía empírica, a explotar las temperaturas extremas para la conservación de sus alimentos. Observó que enfriándolos se retrasaba su alteración; que manteniéndolos en estado congelado se conservaban durante largos periodos de tiempo; que el calentamiento eliminaba los agentes de la alteración de origen microbiano y que, si se evitaba la recontaminación mediante un envasado adecuado, los alimentos térmicamente tratados podían con servarse incluso a la temperatura ambiente. Del mismo modo, averiguó que algunos alimentos, mantenidos a la temperatura ambiente, sufren modificaciones de sus propiedades organolépticas, pero siguen siendo aptos para el consumo y se tornan considerablemente más estables. Así se fue desarrollando una amplia variedad de alimentos fermentados, muchos de ellos asociados en su origen a una determinada raza y a los alimentos frescos localmente disponibles. La sociedad moderna consume cientos de productos fermentados que, pese a que un buen número de ellos se han visto favorecidos por la aplicación de los conocimientos científicos, recientemente descubiertos, siguen siendo esencialmente idénticos a los que se consumían hace varias generaciones.

Las fermentaciones generalmente implicadas son la láctica y la alcohólica, o una combinación de ambas. Si el alimento original contiene un azúcar fermentescible y se encuentra moderadamente salado es probable que se produzca una fermentación láctica Si su sabor es ácido, lo esperable es una fermentación alcohólica. En cualquier caso, para conseguir las características deseadas en el producto fermentado de que se trate, resulta esencial el control de la temperatura, generalmente un ambiente frío. A lo largo de milenios de la historia de la humanidad, sólo las dos últimas generaciones han sido capaces de capitalizar para la conservación y las fermentaciones de los alimentos los principios científicos en que estos procesos se basan. El control y la manipulación de la temperatura se encuentran entre los factores más críticos precisos para el logro de un suministro alimenticio que reúna las propiedades sanitarias organolépticas correctas.

La temperatura el más importante de los factores ambientales que afectan a la viabilidad y el desarrollo microbianos. Aunque el crecimiento microbiano es posible entre alrededor de -8 y hasta +90º C, el rango de temperatura que permite el desarrollo de un determinado microorganismo rara vez excede de los 37º C. Dentro de este rango, la temperatura afecta a la longitud de la fase de latencia, a la velocidad de crecimiento, al número final de células, a las necesidades nutritivas y a la composición química y enzimática de las células. Cualquier temperatura por encima de la máxima de crecimiento de un determinado microorganismo resulta letal para el mismo, y cuanto más elevada sea la temperatura en cuestión tanto más rápida será la pérdida de viabilidad.

Sin embargo, la letalidad de cualquier exposición a una determinada temperatura por encima de la máxima de crecimiento depende de la termorresistencia que es fundamentalmente una característica del microorganismo considerado.

Los microorganismos sobreviven a temperaturas inferiores a la mínima de crecimiento. Los efectos letales de la refrigeración y la congelación dependen del germen considerado, del microambiente y de las condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento. Algunos microorganismos permanecen viables durante largos periodos de tiempo si se mantienen congelados a temperaturas suficientemente bajas. Tras un periodo de ajuste o adaptación al ambiente (fase de latencia) comienza el crecimiento que se acelera hasta alcanzar una etapa de multiplicación rápida y constante, de crecimiento exponencial, denominada fase logarítmica o exponencial.



La depleción de nutrientes y el acúmulo de metabolitos tóxicos termina frenando la velocidad de crecimiento hasta que alcanza un punto en el que muertes y divisiones celulares se igualan, permaneciendo así la población constante durante un periodo al que se conoce con el nombre de fase estacionaria. A esta fase en la que la población es máxima, sigue otra en la que va progresivamente decreciendo a causa de las muertes celulares. La influencia de la temperatura sobre la actividad microbiana es más acusada en los alimentos húmedos, es decir a actividades de agua (aw) superiores a 0,85. La mayor parte de las bacterias son incapaces de seguir creciendo a actividades de agua inferiores. A las temperaturas más elevadas, hay un rango en el que la velocidad de crecimiento, tiempo de generación, se mantiene relativamente estable (óptimo de crecimiento); este rango se halla en torno a 20 – 30º C para los psicrótrofos y 35 – 45° C para los mesófilos. A temperaturas sólo ligeramente superiores a las que son precisas para un crecimiento óptimo se da una inhibición del mismo. Las bacterias termófilas responden de un modo similar, pero su gráfica de crecimiento se encuentra sustancialmente desplazada hacia la derecha. La naturaleza de la respuesta a cualquier temperatura dada se ve profundamente afectada por el tiempo de exposición a la misma. El crecimiento en un ambiente confinado, incluso a la temperatura óptima, cesa llegado un momento determinado a causa del gradual agotamiento de nutrientes.

En atención a sus rangos de temperatura de crecimiento, pueden distinguirse cuatro grupos fisiológicos fundamentales de bacterias: **termófilas, mesófilas, psicrófilas y psicrotrofas**. Los microorganismos mesófilos, muchos de origen humano o animal incluyendo los patógenos y numerosos tipos de los que alteran los alimentos prefieren temperaturas moderadas; ofrecen un óptimo que generalmente se encuentra entre los 30 y 45º C y una temperatura mínima de crecimiento que suele hallarse entre 5 y 10º C. En un medio favorable, el tiempo de generación de muchos mesófilos a la temperatura óptima es de 0,5 horas, o aún menos.

En los termófilos la totalidad de la gráfica que relaciona el crecimiento con la temperatura se halla desplazada hacia el rango de temperatura más alto. La temperatura para un crecimiento óptimo suele hallarse entre 55 y 65º C y en algunos casos es de hasta 75 – 90º C; la mínima se encuentra hacia los 35º C. Todavía persiste cierta confusión con respecto al término psicrófilo. Utilizando los mismos criterios que nos han servido para definir los microorganismos mesófilos y termófilos, es lógico definir los psicrófilos en términos de su temperatura óptima de crecimiento, que debe ser claramente distinta de las de los dos citados grupos. Muchos autores, sin embargo, han clasificado como psicrófilos a todos aquellos microorganismos que son capaces de crecer a 0º C, sin tener en cuenta cual sea su temperatura óptima. Otros distinguen a los microorganismos que toleran las bajas temperaturas en psicrófilos obligados, con óptimos inferiores a 20º C y psicrófilos facultativos con temperaturas óptimas más altas. Reclama más consistencia en la definición que estima debe estar basada en la temperatura óptima; así denomina psicrófilos a los microorganismos que tienen una temperatura óptima de crecimiento alrededor de, o inferior a 15ºC y una máxima de alrededor de 20ºC o menos.

Los auténticos psicrófilos abundan en los ambientes fríos más de lo que al comienzo se pensaba, especialmente en aquellos lugares en los que se mantiene constantemente una temperatura baja. De hecho, el ambiente predominante de la biosfera es frío, dado que las regiones polares y los océanos (95 % en volumen por debajo de 5ºC) representan el 14 y el 71 % de la superficie del planeta, respectivamente. Al aislar psicrófilos es preciso cuidar de un modo especial de evitar la exposición a temperaturas superiores a 10ºC. Al olvido o al desconocimiento de este hecho se deben pasados fallos en la detección de un gran número de psicrófilos.

En la Tecnología de los Alimentos los microorganismos psicrófilos son menos importantes que los psicrótrofos, en virtud de su mayor sensibilidad a las temperaturas elevadas. Los auténticos psicrófilos son generalmente de origen marino siendo en este hábitat en el que mayor interés cobran y comprenden solo unos pocos géneros. Como crecen mejor a temperaturas moderadas, pueden considerarse como un subgrupo de los mesófilos capaz de desarrollarse a temperaturas inferiores a la mínima tolerada por la mayoría de los mesófilos.

Entre los psicrótrofos se incluyen bacterias Gram positivas y Gram negativas; aeróbicas, anaeróbicas, y anaeróbicas facultativas; carentes y provistas de movilidad; esporuladas y no esporuladas. El grupo comprende numerosas especies pertenecientes a no menos de 27 géneros.

También se encuentran cepas psicrótrofas de levaduras y mohos pertenecientes a géneros tan importantes como *Penicillium y Aspergillus*. Temperaturas de refrigeración son aquellas próximas, pero superiores, al punto de congelación de los alimentos, habitualmente se consideran como tales las incluidas en el rango - 1 +7ºC. El efecto de la refrigeración sobre la microflora de un determinado alimento depende de la temperatura y el tiempo de almacenamiento, así como de las características fisiológicas de los microorganismos implicados. A medida que la temperatura desciende por debajo del óptimo, el crecimiento se hace más lento y finalmente se detiene.

En el rango próximo a la temperatura de crecimiento, aumenta rápidamente la fase de latencia, tanto más cuanto más baja sea la temperatura, aproximándose finalmente a infinito. En el *Cladosporium herbanm*, un hongo extremadamente tolerante a las bajas temperaturas, la fase de latencia oscila entre un día a la temperatura ambiente y 18 días a -5º C. Se han citado periodos de latencia de hasta 414 días, pero es dudoso que a lo largo de un periodo tan prolongado se haya llevado un cuidadoso control de la temperatura. En el rango de temperaturas que permite tanto el crecimiento de los mesófilos típicos como el de los psicrótrofos la fase de latencia de estos últimos es mucho más corta.

La velocidad de crecimiento se ve afectada por los cambios de temperatura; por debajo del óptimo, el crecimiento es más lento y en los rangos inferiores por debajo de 0º C) el tiempo de generación puede sobrepasar las cien horas. Las bajas temperaturas tienen una importante acción selectiva sobre las floras mixtas constituidas por mesófilos y psicrótrofos y pueden afectar a la composición de la carga inicial de un alimento determinado, además de conducir a modificaciones de la flora desarrollada a lo largo del tratamiento tecnológico o el almacenamiento.

Así, por ejemplo, una carne vacuna refrigerada obtenida en un clima semitropical ofrece un periodo de vida útil, en condiciones de refrigeración, más largo que el de una carne similarmente tratada procedente de zonas más frías. Esta diferencia es debida al efecto de terminología hoy habitual, este último debe clasificarse como psicrótrofo. De acuerdo con la temperatura sobre la proporción de microorganismos tolerantes de las bajas temperaturas en la carga inicial procedente del suelo y la piel del animal; la carne de bóvido de las áreas más frías tiene una proporción más elevada de psicrótrofos. La temperatura de almacenamiento ejerce una poderosa influencia sobre la microflora de la leche. La leche cruda mantenida a unos 10º C desarrolla una flora en la que dominan los estreptococos acido lácticos, en tanto que si es mantenida en las proximidades de 0º C la flora dominante está constituida principalmente por bacterias Gram negativas psicrotrofas. El enfriamiento rápido de las bacterias mesófilas, desde una temperatura normal de crecimiento hasta 0º C, causa la muerte o lesiona un cierto porcentaje de las células que componen el cultivo. Las bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens*, diversas especies de *Salmonella y Enterobacter aerogenes*, parecen ser más susceptibles al frío que los microorganismos Gram positivos, aunque también se haya observado el shock del frío en *Bacillus subtilis y Clostridium perfringens.* El descenso diferencial de las actividades de las enzimas a bajas temperaturas puede alterar las rutas metabólicas y sus productos finales.

Por ejemplo, los microorganismos que sintetizan pigmentos de fenacina y carotenoides tienden a rendir tasas más altas de estos productos a bajas temperaturas, lo que tiene cierta trascendencia en la alteración de los alimentos. La producción de dextranos extracelulares por *Leuconostoc y pediococos* se ve favorecida por las temperaturas inferiores a las óptimas de crecimiento de estas bacterias. La producción de lipasa y proteinasa por *Pseudomonas* y otros géneros ocurre preferentemente a bajas temperaturas. Algunas de estas enzimas son termorresistentes y pueden persistir después del tratamiento térmico. Muchos de los procesos reguladores del metabolismo celular son sensibles a las temperaturas inferiores a la óptima, de modo que la exposición a las bajas temperaturas puede provocar desequilibrios metabólicos y el cese del crecimiento.

La incubación a bajas temperaturas puede alterar igualmente la composición lipídica de las células microbianas. El contenido lipídico final de las bacterias es independiente de la temperatura de crecimiento, pero el de las levaduras aumenta ligeramente al descender la temperatura. Tanto las bacterias como las levaduras experimentan un incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados a medida que disminuyen las temperaturas de crecimiento. En las bacterias se producen además menos ácidos grasos que contienen el anillo del ciclopropano. También se han citado incrementos en la insaturación de los alcoholes de las ceras producidos por las cepas mesófilas de *Acinetobacter* crecidas a bajas temperaturas. El incremento de la proporción de ácidos grasos no saturados al descender la temperatura se cree esencial para que las membranas cumplan su función, dado que la alteración provocada desciende la temperatura a que los lípidos de la membrana "se congelan".

Los alimentos pueden alterarse bajo la acción de microorganismos pertenecientes a los cuatro grupos en que se han clasificado en virtud de su respuesta a la temperatura: psicrófilos, mesófilos y psicrótrofos. Sin embargo, si los alimentos han sido refrigerados y mantenidos a las temperaturas de refrigeración adecuadas (inferiores a 7º C) la alteración sólo será causada por los psicrótrofos. Aunque los tiempos de generación de los psicrótrofos parezcan muy prolongados, los largos periodos de almacenamiento a refrigeración utilizados en muchos alimentos permiten que la población psicrotrófica alcance tasas de muchos millones por gramo en unos pocos días, lo que frecuentemente resulta en la aparición de alteraciones desagradables en el olor, el gusto y la textura. Deben evitarse las fluctuaciones en la temperatura de almacenamiento porque la velocidad de crecimiento aumenta rápidamente con ella. La mayor parte de los patógenos son mesófilos y, con pocas excepciones, su crecimiento no constituye un problema en los alimentos refrigerados. *Clostridium perfringens* puede crecer a temperaturas entre 12 y 50º C, pero su desarrollo es muy lento por debajo de 15º C. Las células vegetativas del mismo son sensibles a las bajas temperaturas y el almacenamiento prolongado de los alimentos a temperaturas de refrigeración es probable que resulte en su destrucción lenta si las contienen. Los esporos no se ven afectados en el mismo grado por las acciones de las bajas temperaturas. La velocidad de crecimiento se ve afectada además por el pH y la composición del medio, de modo que el crecimiento es más lento en un medio a pH 5,8 que en otro de 7,2 y se ha observado la germinación de esporos a 5º C, es decir, por debajo de la temperatura mínima de crecimiento.

Staphylococcus aureus es capaz de soportar las bajas temperaturas y de crecer hasta a unos 7º C. Pero el límite inferior para la producción de toxinas es algo más elevado. Se han detectado, por ejemplo, enterotoxinas en alimentos mantenidos a 10º C, pero por debajo de 20º C su producción es lenta. Alcanzar niveles detectables de toxina (1 mg/ml) a 13º C exigió en una cepa 158 horas. Otras cepas crecen a 13º C, pero son incapaces de producir toxina a menos de 19º C. En un medio rico, a pH 7, el tiempo necesario para la producción de toxina en cantidades mensurables osciló entre 78 – 98 horas a 19º C y 14 – 16 horas a 26º C. Bajo condiciones menos favorables, la producción de toxina fue más lenta.

Vibrio parahaemolyticus es sensible a las bajas temperaturas y las intoxicaciones alimentarias producidas en Japón por este microorganismo suelen acaecer en los meses más cálidos del año. En la superficie del pescado marino al crecimiento parece cesar a temperaturas inferiores a 5 – 8ºC, aunque el microorganismo puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo. El *Vibrio parahaemolyticus* puede multiplicarse hasta alcanzar niveles peligrosos al almacenar ostras a temperaturas de 10º C durante una semana. La temperatura de crecimiento más baja en medios de cultivo es de 5º C; pero, el crecimiento a esta temperatura se ve fuertemente influido por el pH. *Bacillus cereus* crece en el rango de temperatura de 7º a 45º C y el *Bacillus subtilis* entre 12 y 55º C. *E. coli enteropatógeno* no crece a temperaturas inferiores a las mínimas de los demás *E. coli*. Se han aislado microorganismos similares a la *Yersinia enterocolitica* en carne envasada a vacío y mantenida a 1 – 3º C. También se ha comprobado la producción de aflatoxina, ocratoxina A y tremortinas A y B a 4 – 5ºC en diversos alimentos.

Eh (Potencial Redox)

Mientras que el pH de los alimentos se mide con facilidad y se comprende la significación de su medida, mucho más difícil resulta medir la repetibilidad del potencial de oxidación – reducción (Potencial Redox), sobre todo entre laboratorios diferentes, y además no está clara la significación que en la microbiología del producto tienen los valores hallados. Se piensa que el potencial redox es un importante factor selectivo en todos los ambientes, incluidos los alimentos, que probablemente influye en los tipos de microorganismos presentes y en su metabolismo.

Las diferencias observadas en los productos finales del metabolismo, discernibles por el consumidor por diferencias de color o sabor, pueden ser en algunos casos la consecuencia de diferencias redox. En los alimentos picados (productos cárnicos) o en los productos no homogéneos (emulsiones), el potencial redox puede variar considerablemente de una parte a otra debido a altas concentraciones localizadas de diversos pares redox o de nutrientes como glucosa, fumarato o malato. Cuando se encuentra restringida la difusión gaseosa hacia el centro del alimento pueden existir gradientes de potencial redox desde la atmósfera hasta las partes profundas del alimento. El potencial redox indica las relaciones de oxígeno de los microorganismos vivos y puede ser utilizado para especificar el ambiente en que un microorganismo es capaz de generar energía y sintetizar nuevas células sin recurrir al oxígeno molecular.

Los microorganismos aerobios necesitan para crecer valores redox positivos mientras que los anaerobios frecuentemente requieren valores redox negativos. En diferentes cultivos microbianos el valor redox puede oscilar dentro de un rango comprendido entre una cifra anaeróbica inferior a unos -420 milivoltios (mV) hasta una cifra aeróbica de aproximadamente +300 mV. Los procesos de oxidación y de reducción se definen en términos de migraciones electrónicas entre compuestos químicos. La oxidación es la pérdida de electrones mientras que la reducción es la ganancia de electrones. Cuando se oxida una sustancia (libera electrones) siempre se reduce simultáneamente otra (o sea, capta los electrones liberados). Este concepto electrónico ha sugerido el desarrollo de métodos para estudiar cuantitativamente los procesos de oxidación-reducción reversibles que son vitales para las células vivas. Todo proceso redox reversible puede expresarse así:

$$\textbf{[oxidante] + [H}^{+}\textbf{] + ne = [reductor]}$$

expresión en la que ***ne*** es el número de electrones transferidos en el proceso. El potencial redox (Eh) de tal proceso viene dado por la ecuación concebida y desarrollada originalmente por Nernst en 1975:

$$\textbf{Eh = Eo + (RT/nF) ln [oxidante]/[reductor]}$$

en la que ***Eo*** es el potencial redox estándar a pH 0 pero en presencia de otros solutos a concentración 1 M.

Normalmente se mide como el potencial redox del punto medio a pH 0 y se supone que su valor es igual al valor teórico de los pares redox en solución acuosa diluida, R es la constante del gas molar, T la temperatura en ºK, F la cantidad Faraday de electricidad, n el número de electrones transferidos en el proceso y ln el logaritmo natural. En muchos alimentos es difícil obtener la verdadera medida del potencial redox. Para que el potencial redox de una muestra represente fielmente el del alimento de que fue tomada es esencial que se mantenga inalterado el ambiente gaseoso tanto si el alimento está envasado al vacío, envasado bajo una atmósfera anóxica o envasado en contacto con el aire. Puesto que el potencial redox desciende a consecuencia de la actividad metabólica, el transporte de la muestra deberá realizarse bien en condiciones de refrigeración (0 – 4º C) o a la temperatura de almacenamiento del alimento.

La temperatura. y el tiempo del transporte deberán especificarse para ser consideradas en la interpretación de los resultados. El oxígeno es el principal agente que interfiere la medida del potencial redox. En general no deben usarse en la determinación del potencial redox muestras extraídas porque el oxígeno puede penetrar en la muestra durante el muestreo. Para evitar que el oxígeno contamine las muestras deberá quitarse la capa superior de la muestra de alimento bajo gas inerte para efectuar la medida.

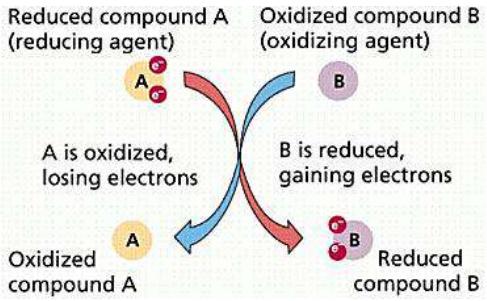
Puesto que los valores de potencial medidos dependen del pH, cada medida de potencial redox deberá ir acompañada de la medida del pH. El pH puede cambiar el potencial redox real, pero también para el mismo valor Eh el pH puede crear condiciones favorecedoras de diferentes tipos de metabolismo. El concepto de rH se introdujo para eliminar por cálculo esta dependencia del pH.

Mientras que el rH puede calcularse exactamente cuando todos los iones hidrógeno están completamente disociados a todos los valores pH, cuando el grado de disociación es alterado por el pH se producen inexactitudes. Además, los ácidos monovalentes alteran el potencial redox 30 mV por unidad pH, los ácidos divalentes 57,7 mV y los ácidos de valencia superior hasta 120 mV. El potencial redox se mide con un electrodo de metal inerte (normalmente platino) en un circuito con un electrodo de referencia. Alternativamente pueden utilizarse colorantes que cambian de color a determinados potenciales redox si bien estos indicadores pueden interactuar con los microorganismos y los alimentos obteniéndose falsos valores. El electrodo de platino responderá a cualquier sistema que produzca una reacción electroquímicamente reversible en la superficie del electrodo, siempre que la velocidad de reacción sea rápida en comparación con la captura o liberación de electrones del electrodo medidor.

Con los modernos sistemas de medida de alta impedancia (10^{13} ohmios) pueden medirse potenciales verdaderos a partir de pares redox que producen corrientes de cambio muy bajo. Para la medida potenciométrica del potencial redox de muestras de alimentos líquidos se usan los electrodos de platino estándar y de calomelano. Para medidas sobre alimentos sólidos se necesita utilizar electrodos especiales con punta de platino afilada, que tengan escaso diámetro y gruesa pared y puentes de CIK-agar en tubos con punta rellena de fibras de asbestos fundido. A diferencia de los electrodos de pH, los electrodos redox requieren cierto tiempo (dependiente del tipo de muestra) para revelar el potencial redox. El potencial redox de los alimentos depende de las cantidades relativas de sustancias oxidadas y reducidas que contengan. Los alimentos que tienen grandes cantidades de tales sustancias son resistentes a los cambios del potencial redox y se llaman "fuertemente tamponados".

De aquí que no sea fácil la interpretación de la lectura arrojada por un electrodo redox insertado en un alimento, puesto que el alimento puede estar o no fuertemente tamponado. En los alimentos débilmente tamponados una pequeña población microbiana ($< 10^5$/g) posiblemente puede causar un cambio del potencial redox, mientras que en los alimentos fuertemente tamponados una población microbiana grande ($> 10^8$/g) apenas puede afectar al potencial redox. Para poder juzgar la significación de cualquier cambio del potencial redox de un alimento hay que tener en cuenta el potencial metabólico y el tamaño de la población microbiana en relación con la capacidad tampón redox del alimento. Las medidas tienen la máxima utilidad cuando existen pares reversibles de componentes conocidos que se encuentran en equilibrio. Todo alimento puede contener pares redox, pero algunos no se encuentran en equilibrio y otros son irreversibles. Se ha sugerido que la sonda redox puede ser un monitor adecuado de alteraciones o cambios deseables durante el almacenamiento de alimentos envasados al vacío, bajo atmósferas de gas anóxico o enlatados.

Se ha visto que indica con exactitud tales cambios profundos en la carne en post rigor mortis, donde se encuentran muchas relaciones empíricas reproducibles entre los eventos metabólicos y el potencial redox. En tales circunstancias los principales sustratos o productos microbianos muestran alta actividad con el electrodo y pueden enmascarar todas las reacciones colaterales o interferentes de forma tal que el potencial redox medido es la verdadera representación del estado del par redox dominante. En presencia de oxígeno todos los pares redox tiende hacia el estado totalmente oxidado. En tales circunstancias el potencial redox aparente será función del logaritmo de la concentración del oxígeno disuelto y por tanto grandes cambios del potencial redox representarán pequeños cambios de la tensión del oxígeno disuelto. El potencial redox y el pH se pueden controlar en los medios de cultivo, y probablemente en los alimentos, ajustando la concentración de O2 gaseoso y de CO2. Aunque en teoría puede alcanzarse un equilibrio estable entre las concentraciones en las fases de gas y de agua (relativas a la solubilidad de los gases en el medio de cultivo y la temperatura), la captación de O2 y la liberación de CO2 por los cultivos microbianos excederá con frecuencia de tales concentraciones.



El potencial redox puede reducirse rápidamente durante la germinación y crecimiento de los esporos puesto que, aunque inicialmente sólo germina una pequeña proporción de los esporos, los esporos que germinan y crecen producen nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADH) y otros reductores que reducen la concentración de oxígeno a un nivel no inhibidor para los esporos remanentes. Esta reducción del nivel de oxígeno y la mayor tensión de H2 producida por el metabolismo celular se traduce en una gran caída del potencial redox. Los ambientes creados en los alimentos pueden categorizarse a groso modo como aquellos en los que el acceso de oxígeno está restringido y en los que no está restringido.

En los que el acceso de oxígeno es limitado, los microbios que se desarrollan producen CO2 + H2O como principales productos finales; aunque la producción de productos finales tales como ácidos orgánicos no son de relevancia, entre los metabolitos secundarlos pueden incluirse aminas, etc. Cuando el acceso al oxígeno es restringido ocurre la fermentación y pueden impartirse cambios de aroma al alimento antes de que se altere. Antes de que tales cambios sean detectables por el consumidor tiene que alcanzarse un alto número de microorganismos ($> 10^6$ /g).

Algunos microorganismos, como los aerobios estrictos y los anaerobios, sólo poseen un sistema metabólico terminal para obtener energía y en consecuencia solamente son activos dentro de un margen de potencial redox relativamente estrecho. Otros, como los anaerobios facultativos, tienen sistemas alternativos que pueden ser puestos en marcha o paro por el potencial redox o la presencia o ausencia de oxígeno.

Sales de curado

Con respecto a las sales de curado, el método en sus comienzos, se desarrolló para conservar ciertos alimentos mediante la adición de cloruro sódico. Una impureza de la sal, el nitrato sódico, se vio que era el responsable de la aparición del pigmento rosa – rojizo de la carne, el llamado color de carne curada. Más tarde se comprobó que el compuesto responsable de la aparición del color era el nitrito y no el nitrato que se originaba por reducción bacteriana del último. En la actualidad se consideran sales del curado al cloruro sódico y al nitrito o nitrato de sodio o de potasio. Aunque el curado constituía originalmente un mecanismo de conservación por salazón, se han desarrollado simultáneamente con aquél varios miles de procesos adicionales principalmente fermentación, ahumado, desecación y aplicación de calor. En los últimos cincuenta años se han ideado una serie de productos curados que solo permanecen estables en condiciones de refrigeración. De hecho, la mayoría de los productos cárnicos curados deben mantenerse en refrigeración para que conserven su inocuidad y salubridad y durante las últimas dos décadas hasta el envasado de muchos tipos de productos curados ha supuesto un factor importante para prolongar el tiempo durante el que el producto mantiene su salubridad.

Además de las sales del curado y de los procesos con ellas relacionados, ya mencionados, en muchos productos cárnicos curados se emplean aditivos conocidos colectivamente como adyuvantes. En ellos se incluyen ascorbatos, fosfatos, glucono lactona y azúcares. Los adyuvantes se emplean fundamentalmente para alcanzar o mantener ciertos cambios deseables; los ascorbatos en relación con el color y los demás con respecto al pH, textura y en ciertos casos aroma. Los adyuvantes también pueden afectar a la sanidad del producto.

El término de "curado" se utiliza mucho en varias industrias siempre en relación con un cambio deseable, por ejemplo, en la preparación de cuero, fabricación de acero, endurecimiento de mortero y también en la conservación de alimentos. Sin embargo, incluso en la industria de los alimentos, la denominación de curado se relaciona únicamente con ciertos productos cárnicos y de pescado y con los quesos. Hasta en estos alimentos la palabra "curado" puede tener distintas connotaciones: a la carne se le adicionan siempre sal y nitrito o nitrato; al pescado, también se le añade siempre sal, mientras que el nitrato se le adiciona en muy raras ocasiones y en el queso, que siempre contiene sal y rarísimamente nitrato, el término curado se aplica a la producción de cambios proteolíticos y lipolíticos deseables. De hecho, el significado de "curados", incluso en la industria de los alimentos depende de la costumbre; por ejemplo, tanto la mantequilla como ciertas hortalizas adobadas necesitan sal como parte de su sistema conservador, pero nunca se les denomina productos curados. Las sales del curado, los adyuvantes y los procesos con ellos relacionados, ya citados, modifican el alimento base.

Entre tales modificaciones se incluyen las del color, aroma, textura y sensibilidad al crecimiento microbiano; éste, dependiendo del producto, puede ser deseable, causar alteración u originar una toxiinfección alimentaria. La historia del curado comenzó hace miles de años cuando el hombre aprendió a conservar la carne por salazón.

La presencia de nitrato en la sal común es responsable del enrojecimiento de este alimento. Sin embargo, el nitrato como tal se utilizaba incluso antes de la era cristiana en las antiguas civilizaciones de China e India. Los escritores romanos describen el curado de la carne por salazón, ahumado y acidificación.

Hacia finales del siglo XIX se sabía que las bacterias reducían el nitrato a nitrito durante el curado de la carne y que el responsable del enrojecimiento era el nitrito y no el nitrato. Sin embargo, hasta 1923 no se permitió en EE. UU. la adición de nitrato a la carne. Actualmente en la mayoría de las carnes curadas se tiende a emplear solamente sal y nitrito, si bien en ciertos productos se utilizan todavía el nitrato o las mezclas de nitrato y nitrito. El nitrato se ha empleado en Europa desde hace unos ciento cincuenta años en la elaboración de quesos salazonados mediante inmersión en salmuera.

La concentración de cada uno de los agentes del curado depende de la naturaleza de los alimentos y de la tecnología empleada en cada país; en donde se dispone de refrigeración suficiente los productos cárnicos más corrientes son los ligeramente salados que necesitan mantenerse en refrigeración. Por el contrario, en climas cálidos y en donde no se dispone de suficiente refrigeración los productos más corrientes son los fermentados e intensamente salados (autoestables). Las carnes curadas pueden dividirse, de forma bastante amplia, en tres grupos: sin calentar, calentadas ligeramente (pasteurizadas hasta una temperatura en su centro de 65 – 75º C) y tratadas a temperaturas altas (autoestables, después de un calentamiento de l00 – 120º C). En general sólo unos pocos productos sin calentar (ciertos tipos de jamón y embutidos, bacon y costillar ligeramente salado) necesitan almacenarse en refrigeración, mientras que la mayoría de los calentados ligeramente deben someterse a refrigeración después de tratados por el calor; sin embargo, los que se someten a temperaturas altas en climas templados y en recipientes herméticamente cerrados son indefinidamente estables.

Cuando se incorpora nitrito a un sistema alimentario se suceden una serie compleja de reacciones cuya naturaleza depende de las características físico-químicas del sistema. Se desconocen muchas de las reacciones. El nitrito adicionado a la carne se convierte en una mezcla en equilibrio de NO^-3, NO^-2 y NO, dependiendo del pH y del Eh. El nitrito desaparece como resultado de sus reacciones químicas con los componentes de la carne o de la actividad metabólica de los microorganismos. Unos pocos componentes de la carne (cisteína e histidina) y los aditivos ascorbato e isoascorbato parece que son los responsables de las pérdidas mayores de nitrito; los agentes reductores median en la conversión del nitrito en óxido nítrico, pero se desconoce el papel de la histidina. Parte del nitrito se convierte en nitrato mediante diversas reacciones químicas especialmente en presencia de ascorbato y en curaciones prolongadas, con tal que exista oxígeno o algún otro aceptor adecuado de hidrógeno. Si el nitrito de los productos enlatados esté en cantidades excesivas, durante el tratamiento térmico puede dar lugar a la liberación de óxidos de nitrógeno gaseosos que pueden causar abombamiento.

Algunos microorganismos también contribuyen a la desaparición del nitrito al utilizarlo como aceptor de hidrógeno. Las levaduras y las bacterias pueden llevar a cabo esta operación en las carnes curadas envasadas al vacío en plásticos impermeables al oxígeno; el desarrollo de ciertas bacterias reductoras del nitrito persiste en este ecosistema hasta que se agota todo el nitrito. En la carne curada enlatada el nitrato sirve de aceptor de hidrógeno de las bacterias aerobias, por ejemplo, *Bacillus spp y micrococos*; generalmente en ausencia de aquél no se multiplican. La reducción microbiana del nitrato o del nitrito a N2O y N2 puede producir abombamiento. Los principales agentes del curado y adyuvantes que afectan al aroma son la sal, el azúcar, el humo y el nitrito. El azúcar se utiliza en bastante cantidad en ciertos tipos de bacon y jamones, pero su contribución al aroma en otros productos es todavía objeto de controversia; el humo, como aromatizante, se estudiará más tarde.

El nitrito reacciona con los componentes de la carne, especialmente de la de cerdo, modificando su aroma y este aroma modificado se acepta más que el de la carne de cerdo curada exclusivamente con sal. La concentración óptima oscila entre 15 y 150 ppm de nitrito, dependiendo del producto. Se desconoce el fundamento químico del aroma del curado a pesar de las numerosas investigaciones realizadas, pero se ha sostenido la hipótesis de que parte del aroma a curado se debe a la ausencia de productos de la degradación oxidativa de los lípidos insaturados.

La sal y el hierro aceleran la oxidación y ésta es más rápida en la carne de cerdo que en la de bóvidos ya que posee más lípidos insaturados que la última. El nitrito retarda la velocidad de la oxidación; por lo tanto, la diferencia entre la carne con y sin nitrito estriba en que en la primera la oxidación de los lípidos es menor. Se han hecho algunos trabajos con salchichas Frankfurt de cerdo y de vacuno elaboradas con y sin nitrito que apoyan esta afirmación: las fabricadas con carne de cerdo sin nitrito o con niveles de nitrito bajos fueron organolépticamente menos aceptables que las de vacuno. Las especias y el ahumado pueden mejorar la aceptación organoléptica de los productos elaborados sin nitrito.

En la carne que ha sido tratada por el calor y refrigerada se ha observado un defecto conocido como "aroma a sobrecalentado" ("warmed over" flavor (WOF)). Se debe al aumento, favorecido por el hierro, de los lípidos oxidados tales como heptanal, n-nona-3,6-dienal y otros compuestos semejantes. El nitrito previene o disminuye la producción de WOF, defecto que también se evita al producirse antioxidantes durante un calentamiento intenso, o adicionando algunos antioxidantes (hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) y galato de propilo). Todo ello está en favor de la hipótesis de que el aroma a curado se debe, al menos en parte, a la inhibición de la oxidación de los lípidos. La adición de nitrito a la carne transforma los pigmentos cárnicos, en especial la mioglobina y en menor extensión la hemoglobina, en un pigmento rojo, insoluble en agua, la oxido nítrica mioglobina. El calentamiento transforma este pigmento en otro rosa, el nitrosil-hemocromo que se estabiliza con los ascorbatos.

Los pigmentos de carne curada pueden originarse por reacciones químicas, bioquímicas o enzimáticas, dependiendo de que se caliente la mezcla carne-nitrito y del tiempo transcurrido entre la adición de nitrito y el calentamiento (Móhier, 1973). La reacción del curado la aceleran el pH bajo, las condiciones reductoras y las temperaturas altas (Fox y Ackerman, 1968); en condiciones óptimas la adición de 15 ppm de nitrito sódico produce el máximo color en los productos picados y emulsionados y unas 50 ppm dan el máximo color al bacon de los flancos. Estas concentraciones de nitrito tienen escaso o ningún efecto antibacteriano; las bacterias no ejercen otro papel fundamental en la producción del color salvo reducir el nitrato a nitrito y en ciertos productos bajar el Eh y el pH. El Eh desciende también bajo la acción del calentamiento y del ascorbato y el pH bajo el efecto de la glucono-d-lactona y del pirofosfato ácido de sodio.

La reacción principal parece ser la formación de un intermediario nitroso reductor entre el nitrito y los diversos agentes reductores y la escisión del intermediario para liberar óxido nítrico. Entonces el óxido nítrico producido reemplaza al agua unida al hierro en la porción hemo de la mioglobina o hemoglobina. En la carne hay muchas reacciones que compiten por los ascorbatos. Los ascorbatos tienen interés como aceleradores del desarrollo y estabilizadores del pigmento de la carne curada. Influyen además en la actividad anticlostridial del nitrato en las carnes pasteurizadas enlatadas, cuyo efecto aumenta si existe una proporción adecuada de ascorbato disminuye cuando su concentración es excesiva. Sus principales efectos beneficiosos en las interacciones químicas que tienen lugar en las carnes curadas son: (1) como agentes reductores y (2) como quelantes. Los ascorbatos como agentes reductores actúan como consumidores de oxígeno; disminuyen el Eh; participan en la reducción de la metamioglobina a mioglobina; reaccionan con el nitrito para aumentar la producción de óxido nítrico que reacciona entonces con la mioglobina para dar óxido nítrico mioglobina. Los ascorbatos secuestran a prooxidantes tan activos como el cobre y el hierro; la quelación del hierro puede ser una de las razones por las que aumenta la actividad anti botulínica del nitrito.

Radiaciones y microorganismos

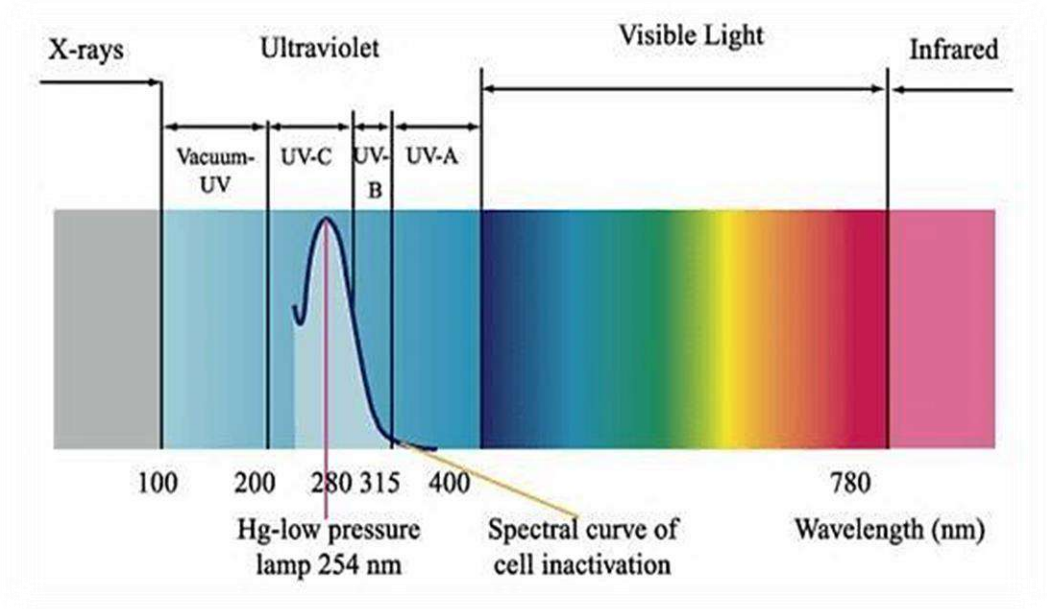
Con referencia al conjunto de radiaciones potencialmente utilizables para su aplicación en los alimentos, es necesario distinguir dos categorías diferentes. La primera, es la radiación de frecuencia relativamente baja y de longitud de onda más larga que la de la luz visible, aproximadamente de 10^7 a 10^{10} Hz* (*Hz = Hertz, 1 Hz = 1 ciclo por segundo; frecuencia (en Hz) n longitud de onda (en metros) = 3 n 10^8), o sea, las que van desde la onda corta de la radio (10 megaciclos) pasando por la longitud de onda del radar, e incluyendo los infrarrojos aproximadamente 10^{12} - 10^{14} Hz. Estas radiaciones poseen un bajo poder energético y por lo general su acción sobre las moléculas produce frotamiento con elevación térmica. En la segunda categoría, están las radiaciones de longitud de onda más corta que las de la luz visible, con frecuencias de aproximadamente 10^{15} Hz o más, las cuales poseen el suficiente poder energético para excitar o modificar las moléculas orgánicas y por tanto son capaces de desarrollar una acción letal específica. Las radiaciones de más baja frecuencia y energía, en la zona ultravioleta (UV) del espectro, sólo son capaces de excitar a las moléculas y son las que se van a estudiar en este capítulo. Aquellas otras de más alta frecuencia, desde 10^{18} Hz y más, tienen la suficiente energía para romper las moléculas en partes con cargas distintas llamadas iones y a estas radiaciones se les llama “Ionizantes”

La zona UV del espectro se extiende por debajo de la longitud de onda de 450 nm. La longitud de onda más eficaz para la destrucción de microorganismos está alrededor de 260 nm. con un cuanto de energía aproximadamente de 4,9 electrón voltios (eV). Longitudes de onda inferiores a 200 nm. no son eficaces porque se absorben muy rápidamente por el oxígeno atmosférico. Las longitudes de onda desde 360 a 450 nm. se les suele llamar "onda larga ultravioleta", "luz negra" o "ultravioleta próxima". Se utilizan frecuentemente para producir fluorescencia, así, por ejemplo, para demostrar la presencia de pigmentos de Pseudomonas en huevos, mediante lámparas ultravioletas. Estas ondas atraviesan fácilmente el cristal y tienen efectos limitados sobre los microorganismos. Las radiaciones ultravioletas se encuentran en algunas fuentes luminosas de temperatura alta, por ejemplo, en la luz solar o en lámparas de arco voltaico), y en ciertos tubos fluorescentes.

En la práctica, la fuente habitual de UV es la lámpara de vapor de mercurio de baja presión, que emite varias longitudes de onda específicas, algunas de luz visible, pero alrededor del 80 % del total, es emisión UV a 254 nm., la cual tiene sólo el 85 % de la actividad biológica que correspondería a los 260 nm. Esta lámpara debe estar construida con un cristal especial que absorba las radiaciones por debajo de 200 nm. las cuales, si son absorbidas por el oxígeno atmosférico, producen ozono, lo que no es conveniente. Las lámparas de mercurio de alta presión que se utilizan para la iluminación, tienen poco poder germicida. Están empezando a utilizarse ahora, las lámparas laser activadas, de mucho más rendimiento.

La longitud de onda con efectos más letales, alrededor de los 260 nm., es la que en su mayoría se absorbe por las bases de los ácidos nucleicos y existen numerosos datos que indican igualmente que los ácidos nucleicos son el blanco principal de la radiación UV. Sin embargo, por lo que se refiere a los alimentos, es igualmente absorbida al instante por varias sustancias de importancia. Ya se ha señalado la absorción por el oxígeno de las longitudes de onda más cortas. La absorción por el agua está en razón de su transparencia, en el agua pura, la intensidad de absorción se reduce aproximadamente dos tercios por cada 5 cm. de profundidad, pero en agua de río, se absorben dos tercios de energía solamente en 1 cm. de profundidad. Su actividad se ve también afectada por determinados iones, como, por ejemplo, Fe^{+++}. Proteínas y bases también absorben la radiación UV de manera importante, así que, en la leche, por ejemplo, una capa de aproximadamente 0,1 mm. de espesor es capaz de absorber el 90 % de la energía incidente.

La absorción es aproximadamente proporcional a la concentración de las sustancias citadas, aunque puede decirse que la penetración es siempre menor en los alimentos sólidos. Puesto que la penetración de la radiación UV es pequeña en los líquidos e insignificante en los alimentos sólidos, su principal aprovechamiento reside en la destrucción de microorganismos suspendidos en el aire o que se encuentren sobre las superficies. Sin embargo, los gérmenes pueden ser también resistentes si se encuentran cubiertos por capas de sustancias protectoras, tales como aerosoles o sobre superficies húmedas o de alimentos grasientos. La intensidad de radiación de distintas longitudes de onda, se puede medir por métodos físicos, pero no se conoce un método sencillo para determinar la dosis efectiva, la cual se debe apreciar teniendo en cuenta el tiempo y la distancia de una determinada lámpara. Son confusos los intentos para medir directamente los efectos sobre los microorganismos, debido a la gran influencia de los factores extrínsecos e intrínsecos. Cuando una población uniforme de células microbianas, esporos, o conidios se irradia a una intensidad constante, el número de supervivientes disminuye exponencialmente con el tiempo (o sea, con la dosis total de la radiación aplicada).



De aquí se deduce que conviene expresar la resistencia de una especie de microorganismos, como la dosis necesaria para reducir el número de supervivientes a un décimo (esto es, 90 % de letalidad), una cantidad que es virtualmente independiente del número absoluto de microorganismos implicados y de la clase de dosis. Esta cantidad, como sucede en situación semejante con el tratamiento por el calor, se la puede llamar valor D o "dosis de reducción decimal", Valores D específicos son: *Serratia marcescens, 1500 µW seg; Escherichia coli, 2000 µW seg; esporos de Bacillus mesentertcus, 10.000 µW seg.* Para establecer cada valor D con la radiación UV, se necesita mucho más cuidado que con las radiaciones ionizantes.

Existe una falta de información precisa sobre la susceptibilidad de las diferentes especies microbianas a la radiación UV. Diferentes cepas de una misma especie pueden tener una resistencia distinta, y la comparación de los datos obtenidos por técnicos diferentes, dan lugar a errores, por haber trabajado con condiciones de irradiación no superponibles, distinta edad de los microorganismos, etc. Consecuentemente, existen discrepancias manifiestas en la literatura disponible. Hablando de una manera amplia, se ha afirmado que los bacilos no esporulados gram-negativos son los que se destruyen más fácilmente con la radiación UV; *los estafilococos y los estreptococos* necesitan una dosis aproximadamente cinco veces mayor, los esporos bacterianos alrededor de 10 veces y las esporas de los hongos (sin agua) alrededor de 50 veces.

No obstante, en términos amplios, el orden de resistencia a la radiación UV entre las bacterias, guarda cierta semejanza con el que presentan a las radiaciones ionizantes. Esto es bastante diferente en otras agrupaciones más heterogéneas; así las levaduras son aproximadamente tan resistentes como las bacterias a la radiación UV, mientras que los hongos lo son todavía mucho más, con las radiaciones ionizantes sucede todo lo contrario. La radiación UV de la clase e intensidad descritas aquí, durante su utilización práctica, posee un peligro inmediato para los obreros, para su piel y especialmente para sus ojos. Son esenciales los exámenes periódicos y/o las limitaciones en el tiempo de exposición. Mientras que se ha divulgado mucho aquello que se refiere a los efectos mutagénicos de las radiaciones ionizantes, poco se ha dicho sobre el peligro de tales mutaciones cuando se utilizan radiaciones UV, quizás se debe a que una larga experiencia sin precauciones especiales, y sin efectos nocivos, ha demostrado que el riesgo es insignificante. Si la lámpara ultravioleta produce una emisión por debajo de 200 mn., existe la posibilidad de que se produzca ozono, el cual, favorece además la oxidación de las grasas, siendo tóxico para el hombre en concentraciones no detectables aún por su olor. El mayor valor del tratamiento con radiaciones UV se encuentra en el saneamiento del aire, por lo que se utiliza ampliamente con ese objeto. También puede aplicarse para esterilizar superficies de alimentos o para el equipo de los manipuladores de alimentos. En los laboratorios de microbiología de los alimentos, las lámparas ultravioletas se utilizan para esterilizar el aire en aquellas zonas que contienen cultivo, este uso puede tener un valor especial, cuando las condiciones industriales producen atmósferas fuertemente contaminadas. Igualmente, la luz UV puede servir para controlar en las panaderías el crecimiento sobre el pan de las esporas de los hongos, o para el control de la propagación de los microorganismos en la superficie, pero no en el interior, de los pasteles de crema.

En jarabes de azúcar concentrados contenidos en depósitos grandes, por otro lado, microbiológicamente estables, la condensación en la zona superior tiende a que la concentración de azúcar se diluya y sea menor en la superficie del jarabe, lo que permite en la misma, el crecimiento de los hongos que se encuentran en el aire. Esto se puede prevenir instalando lámparas UV sobre la zona superior de los depósitos. Debido a la limitada penetración de la radiación UV, los líquidos se deben exponer en capas delgadas para facilitar su absorción. Aunque en principio, la luz UV es excelente para el tratamiento del agua, la necesidad de exponerla solamente en capas no mayores de 1 cm. de grosor, da lugar a que el equipo sea complejo y costoso, teniéndose además que clarificar primero el agua. Para destruir una cifra importante de microorganismos, se necesitan tiempos de exposición relativamente largos, así que el rendimiento es bajo. Estas limitaciones hacen este procedimiento menos práctico que la cloración. Para el tratamiento de la leche se necesita exponerla en capas muy finas bajo la fuente de irradiación, haciendo que el control sea difícil y el rendimiento muy bajo. Este tratamiento facilita la oxidación de la grasa y la formación de olores anormales. Por esto, aunque en condiciones apropiadas se puede reducir el número de bacterias en 90 – 99 %, el procedimiento no tiene valor práctico.

La irradiación ultravioleta puede efectivamente destruir los microorganismos de una superficie, por sólo si la superficie previamente se ha limpiado bien y si ha sido sometida a la exposición un tiempo suficiente. Es normal, que sólo estas superficies irradiadas directamente así, se sanean, porque incluso el cristal corriente es relativamente opaco a las longitudes de onda germicidas. La irradiación ultravioleta se puede utilizar para esterilizar envases donde otros métodos como el calor, no se pueden aplicar. Generalmente los envases deben estar abiertos para permitir que penetre la irradiación, como, por ejemplo, en el tratamiento del material utilizado para los envases de llenado aséptico de la leche uperizada (UHT). Sólo si el material es transparente para la radiación UV como, por ejemplo, algunas bolsas de plástico delgado, se puede tratar el interior sin abrir el envase. El azúcar utilizado en las conservas puede contener esporos termófilos, los cuales son difíciles de destruir, excepto por radiaciones UV. Aproximadamente 10 esporos de *Bacillus stearothermophilus* por gramo de azúcar se pueden destruir con una exposición de unos 30 minutos, actuando sobre capas de azúcar de 4 mm. de espesor, esta penetración quizás esté ayudada por reflexiones múltiples de las superficies de los cristales.

El tiempo de exposición se puede acortar si la capa de azúcar se remueve, pero se alarga mucho si el azúcar tiene terrones. El azúcar se altera poco por la luz UV. Otra aplicación en la industria alimentaria, es en las cámaras de refrigeración utilizadas para almacenamiento de la carne con objeto de impedir el crecimiento de microorganismos en la superficie. La disminución de la contaminación procedente del aire parece ser poco importante. Aunque la energía que se aplica actualmente a la superficie de la carne es más bien baja, y los microrganismos son numerosos e íntimamente incrustados en ese substrato protector, existen sin embargo datos frecuentes asegurando que su utilización permite aumentar el tiempo de almacenamiento. Se puede decir de forma general, que los microorganismos se ven afectados, solo cuando la exposición a la radiación ultravioleta incide directamente sobre estas superficies sólidas.

Sin embargo, la producción de ozono o la reflexión de los rayos UV pueden tener un efecto menor sobre los microorganismos que se encuentran sobre superficies no directamente expuestas. El problema a resolver aquí, no obstante, no es la esterilización, sino más bien el frenado de la multiplicación microbiana; en este caso la radiación se aplica de una forma continuada. Con un microorganismo multiplicándose a razón de 10 escisiones en un periodo de 10^4 - 10^5 seg. aproximadamente, y a una dosis de reducción decimal de 10 - 10^3 µW seg. En efecto los periodos de frenado son así más largos, los factores de crecimiento más bajos, y el máximo de concentración celular más pequeño, incluso con intensidades de irradiación tan bajas se consiguen estos efectos en la superficie de la carne.

Por ejemplo, sometiendo carne que contiene *Pseudomonas* causantes de alteración a irradiación UV, se reduce su factor de crecimiento al 85 % aproximadamente, comparando con una carne testigo no irradiada y utilizando una intensidad en la superficie de 2 µW/cm^2 y de 24 µW/cm^2 para aproximadamente el 75 %. Para retrasar la reproducción en la superficie de la carne de los hongos procedentes del aire, es suficiente con una intensidad de 0,2 µW/cm^2 e igualmente eficaz para restringir la propagación de colonias bacterianas. Lo anterior se consigue actuando a 0º C y en una atmósfera semisaturada [equilibrio de la humedad relativa (EHR) 0,993]; con un EHR de 0,985 se redujo más el crecimiento. La apariencia de mejoramiento fue mayor de lo que realmente se había conseguido, debido a que la irradiación actuó eliminando sólo el crecimiento de la superficie de la carne. Una intensidad de 2 µW/cm^2 detuvo la formación de las hifas de los hongos, y 24 µW/cm^2 relegaron el crecimiento bacteriano a las zonas capilares por debajo de la superficie de la carne.

Las colonias formadas fueron difícilmente visibles y muchas de las bacterias desarrolladas tenían formas largas filamentosas. El costado "iluminado" de una canal situada a 2 m. de una lámpara sencilla de 25 vatios, puede absorber una intensidad aproximada de 0,2 µW/cm^2, dosis que puede ser significativa, e incluso se puede incrementar esta dosis si la habitación tiene paredes con superficies reflectantes. La eliminación de los olores de la alteración por la radiación UV puede engañar al comprador, haciéndole creer que el alimento está fresco y en buenas condiciones. Este efecto no podría conseguirse por la introducción, en su lugar, del ozono.

La radiación ultravioleta es inadecuada para su utilización en ciertos alimentos ricos en grasas, especialmente grasas insaturadas, puesto que acelera enormemente la formación de olores a rancio debido a su fuerte acción catalítica sobre la oxidación de los lípidos (manteca expuesta a la luz del sol). Por esto, debe restringirse su utilización con productos lácteos, y es mucho más eficaz en las cámaras de refrigeración, para tratar carne de cordero o de vaca que para la de cerdo. La radiación UV produce daños en verduras, formando manchas decoloradas en las hojas. La temperatura, dentro de la escala normal de 0ºC a 40ºC, apenas tiene efecto sobre la sensibilidad para las radiaciones UV. Microorganismos expuestos a la radiación UV se muestran después más sensibles al calor y viceversa, como ocurre también con las radiaciones ionizantes. Los efectos letales de la radiación UV, a diferencia de los de la radiación ionizante, no se incrementan mucho con la presencia de oxígeno.

La radiación ultravioleta, inhibe la división celular antes de que alcancen el tamaño adecuado; por esto, las dosis subletales dan lugar a la formación de células filamentosas, las cuales más tarde o reanudan la división celular normal o mueren. Las condiciones que se presentan después de la irradiación tienen una gran influencia en la recuperación de las células irradiadas. Aunque el tema es extenso, poco ha sido lo que se ha encontrado importante para su aplicación en los alimentos; lo más digno de tenerse en cuenta son los efectos revitalizadores de la luz visible ("foto reactivación") y las indicaciones de que la recuperación de la facultad de crecer tiene lugar mejor en medios sencillos y a temperaturas por debajo de las consideradas como óptimas. Existe, además, otro tipo de radiación ionizante que se caracteriza por poseer un alto contenido de energía, gran poder de penetración, y acción letal debida a su liberación a nivel celular. Hasta hace poco, las aplicaciones principales de la radiación ionizante han sido en el campo de la medicina, en técnica industrial y como procedimiento para estudios genéticos, así como la función y estructura de los microrganismos.

La aplicación práctica de la radiación ionizante para destruir microorganismos en productos comerciales (principalmente farmacéuticos) solo se ha desarrollado en las últimas décadas. La letalidad para los microorganismos de las radiaciones "alfa", ß, "gamma" y de los rayos X se conocía ya a principios de siglo. Con la excepción de los rayos X, los métodos para la producción de radiaciones ionizantes de una forma económica y controlada y teniendo la intensidad precisa para poderlas utilizar en la industria en gran escala, no estuvieron a punto hasta después de la Segunda Guerra Mundial, cuando los intensos estudios sobre la fisión atómica para fines militares, tuvieron como resultado una más amplia y clara comprensión de las fuentes y de los orígenes de la radiación ionizante, además de una gran acumulación de conocimiento técnico en este campo.

La atención pública se concentró en los usos pacíficos de la energía atómica, y trabajos sobre la conservación de los alimentos por este procedimiento, se iniciaron en varios países durante la pasada década del 50 y han continuado desde entonces con intensidad variable. Al comienzo, sólo se interesaron los pocos países que poseían tecnología atómica, como Estados Unidos, el primero en este campo, pero en los últimos años, el interés sobre la irradiación de alimentos se ha extendido a muchos otros países. Los primeros trabajos establecieron claramente la utilidad en potencia de la irradiación como un procedimiento de conservación de los alimentos e indicaron desde un punto de vista práctico, que los dos mejores métodos utilizables, serían un dispositivo-generador de electrones (radiación ß) y las radiaciones y originadas en la desintegración de isótopos radiactivos (como el ^{60}Co) formado como un subproducto en el funcionamiento del reactor.

Durante la década de 1960 algunos Gobiernos permitieron la utilización de la radiación ionizante para tratar un número limitado de alimentos. Posteriormente, esta autorización fue anulada en Estados Unidos, debido a que los trabajos de experimentación, indicaron que la irradiación podría inducir a la formación de compuestos potencialmente mutagénicos, teratogénicos, o cancerígenos, en determinados alimentos.

Investigadores de varios países, están estudiando la inocuidad de diversos alimentos irradiados en experiencias con animales, por test de mutagenicidad sobre células y de teratogenicidad (mutaciones letales) con extracto del producto. Por el momento, los resultados confirman la inocuidad del procedimiento, y parece probable que la irradiación podría aprobarse de nuevo como un método de tratamiento de los alimentos. La radiación ionizante presenta algunas ventajas en comparación con otros procedimientos en lo que se relaciona con la destrucción de bacterias en los alimentos:

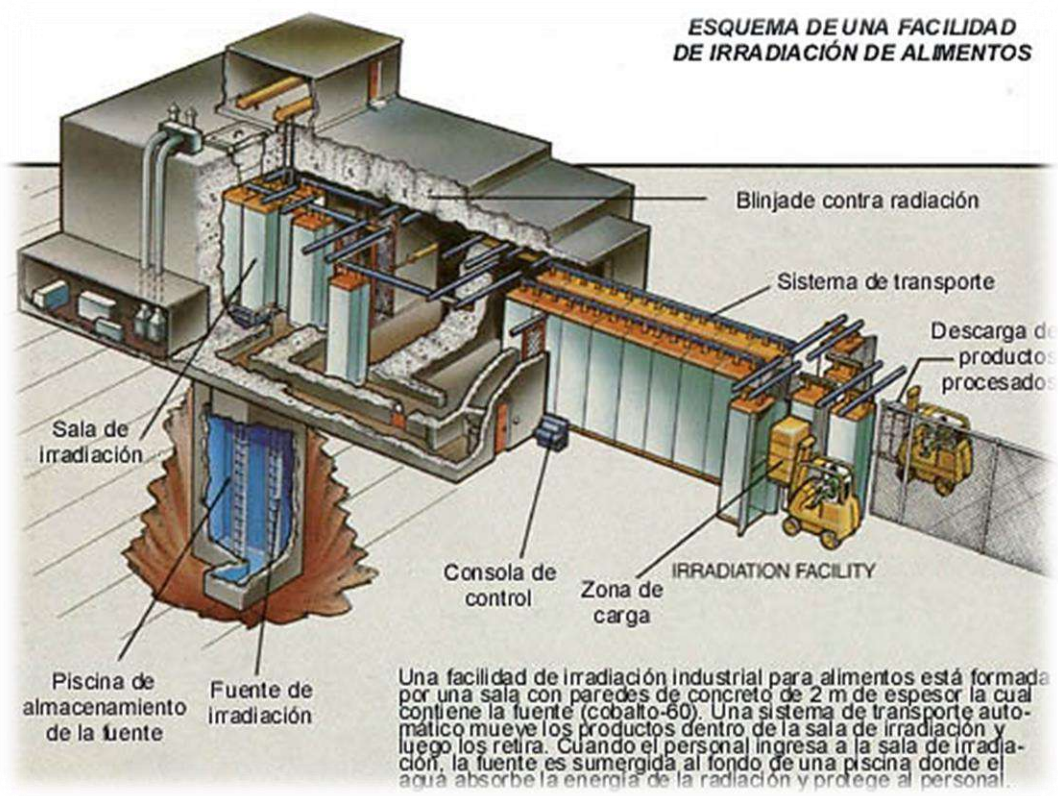
- Es altamente letal, pero la dosis puede ajustarse para producir efectos pasteurizantes o esterilizantes.
- A niveles bajos (< 0,5 Mrad), no produce cambios organolépticos detectables en el producto.
- Incluso con dosis altas (> 1 Mrad) son pequeños los cambios químicos totales producidos en el alimento.
- No deja residuos que no pertenezcan al alimento.
- Se produce muy poco calor, por lo que los productos crudos mantienen las características del alimento fresco, pudiéndose incluso tratar los alimentos previamente congelados.
- La penetración de la radiación es instantánea, uniforme y profunda, permitiendo un control preciso del procedimiento (en contraste con el calor).

Existen no obstante ciertos inconvenientes:

- Normalmente no son inactivadas las enzimas cuando se utilizan dosis bactericidas, por lo que pueden permanecer activas en los alimentos durante el almacenamiento.
- Los cambios químicos, aunque pequeños en su totalidad, pueden dar lugar a alteraciones organolépticas inaceptables en ciertos alimentos sensibles o en alimentos que se han sometido a dosis altas. Estos cambios se asocian generalmente con la presencia de radicales libres, los que a su vez pueden actuar también como un factor bactericida secundario.
- Algunos estudios han sugerido que la irradiación de alimentos puede inducir a la formación de factores mutagénicos, teratogénicos, cancerígenos o simplemente tóxicos, aunque juicios recientes y autorizados, sugieren que tales afirmaciones eran muy infundadas (Comité de Expertos FAO/OIEA/OMS, 1977).
- Las dosis utilizadas para destruir microorganismos son varias veces superiores que las precisas para matar a un hombre y por lo tanto deben tomarse medidas de seguridad muy estrictas para proteger a los obreros y a los manipuladores de alimentos. Esto obliga a utilizar una fuerte protección alrededor de la fuente radiactiva y a controlar continuamente al personal y a la zona de trabajo. La radiación a los niveles de energía utilizados para los alimentos (< 2 MeV) no producen radiactividad inducida.

Sin embargo, puede producirse radiactividad inducida con radiaciones de alta energía que pasen de 10 MeV, lo que resulta impropio para el tratamiento de alimentos. Las radiaciones ionizantes se caracterizan por atravesar instantáneamente la materia estando en relación este dato con la clase de radiación y la densidad del material a tratar. Para una energía determinada, la radiación gamma es mucho más penetrante que los electrones.

La radiación ß con energía de 3 MeV tiene una capacidad de penetración en el agua de 1 cm aproximadamente y se comporta de forma semejante en alimentos líquidos o sólidos de una densidad similar, mientras que la radiación y con energía de 1,1 MeV procedente del ^{60}Co penetra en un alimento alrededor de 20 cm, pero sin embargo la frena una plancha de plomo de parecido grosor. Con ambas clases de irradiación, simultáneamente, es posible conseguir una absorción lo suficientemente uniforme para que llegue a todos los puntos de un alimento que sea aproximadamente el doble de grueso. Además, estableciendo una "geometría" adecuada y normalizando las formas, la distribución de la dosis por todas las partes del alimento puede llegar a ser casi uniforme. Cuando el daño molecular tiene lugar en una parte vital de una célula viva, esta célula muere, y existe una gran evidencia que indica que ocurre esto en la alteración del núcleo o el material nuclear.



En una pequeña proporción de casos la alteración da lugar a una mutación. Los organismos mayores mueren con dosis de radiación ionizante mucho más pequeñas, por tanto, cuando se utilizan dosis de 100 Krad con objeto de destruir bacterias, la radiación debe actuar de forma que no pueda llegar hasta los operarios. La dosis se mide normalmente mediante dosímetros, mientras que la fuente se regula con monitores en cámaras de ionización modificadas. Los dosímetros que se utilizan más corrientemente son cristal de cobalto, sulfato ferroso, o sulfato ceroso.

El cristal de cobalto cambia de color proporcionalmente a la dosis que recibe. Las sales ferrosas y cerosas son oxidadas a sales férricas o céricas como resultado de la interacción con radicales hidroxílicos producidos por la radiación del agua. En un paquete con alimentos expuesto a una fuente de radiación ionizante, la distribución de la dosis no puede ser uniforme.

Se encuentran variaciones entre 100 y 125 % y esto se debe conocer anticipadamente para calcular el tratamiento a que tienen que someterse los alimentos. El cálculo de la dosis letal para los microorganismos está en relación con el número de supervivientes y los cálculos matemáticos son en cierto modo similares a los utilizados en el tratamiento térmico. La muerte de los microorganismos es una consecuencia de la acción ionizante debida a la radiación de alta energía. La mayoría de los estudios indican que una causa primordial de letalidad es la alteración sufrida por el ADN microbiano, lo que da lugar a una pérdida de la capacidad reproductora, pero la alteración de otras moléculas sensibles e importantes puede tener lugar también. Las dosis letales para los microorganismos no inactivan a la mayoría de los enzimas, ni tienen lugar cambios importantes en las proteínas y otras moléculas grandes.

Se forman radicales libres y otras moléculas reactivas, particularmente en el agua, aunque no está claro hasta dónde llega la ionización primaria ("golpes directos") y hasta donde los efectos secundarios como responsables de las alteraciones letales en los microorganismos. En los alimentos irradiados, la alteración subletal puede impedir la revitalización de ciertas bacterias. Los microorganismos difieren mucho en lo que se relaciona con su sensibilidad a la irradiación. En sentido general la muerte de microorganismos de poblaciones expuestas a las radiaciones ionizantes es de naturaleza logarítmica.

Por tanto, si un cultivo o una suspensión de una cepa pura de un microorganismo se expone a la acción constante de la irradiación ionizante letal, una fracción constante de la población microbiana morirá a intervalos de tiempo iguales, con independencia del número total. En la práctica, esto significa, que un gráfico del logaritmo de los supervivientes frente a las dosis, es una línea recta en casi toda su longitud.

En algunos casos puede aparecer al comienzo de la curva un pequeño "hombro". Esto puede deberse a fenómenos no relacionados con la sensibilidad real a la irradiación de los microorganismos, como puede ser la agrupación de células, o a que existen por lo menos dos zonas sensibles en la célula, las cuales es necesario que se inactiven antes de que dichas células pierdan su viabilidad. Desde el punto de vista matemático, la situación es semejante a la muerte producida por calentamiento, y el valor D (tiempo de reducción decimal) concepto de los termo bacteriológicos, se aplica igualmente a la muerte por irradiación. El valor D, se define como la dosis necesaria para reducir la población microbiana a una décima parte (log 10 1). Luego un tratamiento 2D equivaldría a una dosis suficiente para reducir la población microbiana a la centésima parte.

La resistencia de los microorganismos a los efectos letales de la irradiación, aumenta en ausencia de oxígeno, lo que sugiere que tienen importancia las reacciones de oxidación que se originan como consecuencia de la irradiación. También aumenta la resistencia de los microorganismos a la radiación ionizante en ausencia de agua.

En substratos completamente deshidratados, se requieren dosis 2 a 3 veces más altas para obtener efectos microbicidas equivalentes a las precisas en substratos hidratados, esto se debe a que se aminora la ionización secundaria, así como también a los efectos de los radicales libres que se citan más adelante. Congelando, con lo que efectivamente se inmovilizan las moléculas de agua, se producen efectos protectores similares, debidos posiblemente a la inmovilización de las moléculas reactivas retenidas por la malla de cristales de hielo hasta que se deshacen. Debe señalarse que el efecto es menor en los esporos, presumiblemente debido al secuestro del agua en la estructura de los mismos. El sustrato influye en la sensibilidad a la irradiación. Por esto, pueden necesitarse dosis distintas para conseguir efectos microbicidas semejantes en alimentos diferentes. Además, los alimentos pueden producir condiciones anaeróbicas localizadas, incluso cuando el oxígeno está presente en el exterior, y esto puede influir de una forma importante en la resistencia a la irradiación. La sensibilidad a la radiación de los microorganismos difiere según las especies e incluso según las cepas, aunque las diferencias de resistencias entre cepas de una misma especie son generalmente lo suficientemente pequeñas para no tenerlas en cuenta a efectos prácticos. Las bacterias gram-negativas, incluyendo los microorganismos causantes de alteración de los alimentos *(Pseudomonas)* y las especies entéricas, incluyendo las patógenas *(Salmonella, Shigella)*, son generalmente más sensibles a la irradiación que las bacterias gram-positivas. El *estreptococo fecal* es bastante resistente, los esporos bacterianos son todavía más resistentes, y el *Micrococcus radiodurans* es excepcionalmente resistente.

Ácidos orgánicos

En el apartado de los ácidos orgánicos y sus ésteres, se sabe que los mismos, se hallan muy difundidos en la naturaleza. Se encuentran con frecuencia en frutas; por ejemplo, el ácido cítrico de los frutos cítricos, el ácido benzoico en arándanos agrios y las ciruelas verdales, el ácido sórbico en la fruta del fresno. El ácido láctico se encuentra en los tejidos animales; el galato de metilo en las hojas de diversos géneros de plantas y en las especias se encuentran varios ácidos orgánicos. Muchos de ellos constituyen metabolitos intermediarios y productos finales del metabolismo microbiano y se encuentran en grandes cantidades en muchos productos lácticos, cárnicos y vegetales fermentados.

Nuestros antepasados descubrieron que los cambios deseables desarrollados sobre el aroma y la textura de estos productos y la acidez provocada por la formación de ácidos orgánicos constituía un medio valioso para retrasar o evitar la alteración proteolítica. Ello permitió conservar almacenados muchos alimentos perecederos y hacer la dieta más variada. Hoy en día muchos fabricantes utilizan ciertos ácidos orgánicos para ayudar a la conservación de diversos productos.

Sin embargo, la concentración y el tipo de ácidos orgánicos permitida son cuidadosamente controlados por los organismos gubernamentales responsables de la Sanidad, y las concentraciones permitidas son generalmente pequeñas, comparadas con las de los ácidos orgánicos en muchas frutas y productos fermentados. Por su solubilidad, sabor y baja toxicidad los ácidos orgánicos de cadena corta, tales como el acético, benzoico, cítrico, propiónico, y sórbico son muy utilizados como conservadores o acidificantes. Al considerar la posible utilización como conservadores de otros ácidos orgánicos es conveniente recordar que la actividad antimicrobiana de estos compuestos suele ser superior a medida que se alarga la longitud de su cadena molecular. Sin embargo, los ácidos alifáticos de más de diez u once átomos de carbono poseen muy poca aplicación potencial debido a su muy baja solubilidad en agua.

Los métodos de análisis de los ácidos orgánicos en los alimentos se basan generalmente en una destilación en corriente de vapor, o por solventes, seguido de una valoración del tipo y proporción del ácido (o ácidos) en cuestión presentes en el destilado mediante espectrofotometría o cromatografía. La actividad antimicrobiana de un ácido orgánico o su éster se debe a las moléculas no disociadas de este compuesto. Algunos ácidos orgánicos en su estado no disociado son muy solubles en las membranas celulares. Únicamente los ácidos orgánicos lipófilos muestran actividad antimicrobiana al inhibir el crecimiento de los microorganismos, interfiriendo con la permeabilidad de la membrana celular. Los ácidos orgánicos saturados, como el ácido sórbico y los ésteres del ácido parahidroxihenzoico, también inhiben el sistema de transporte de electrones. Este fenómeno da lugar a la acidificación del contenido celular, que es probablemente la principal causa de la inhibición y muerte de los microorganismos. El pKa (pKa = al pH en el cual el 50 % del ácido se halla no disociado) de los ácidos orgánicos empleados como conservadores se halla en el rango de pH de 3,5. Al bajar el pH de un alimento, aumenta la proporción de las moléculas no disociadas de un determinado ácido orgánico, aumentando de esta forma su efectividad como agente antimicrobiano. Estas consideraciones limitan la utilidad de los ácidos orgánicos a aquellos alimentos de pH inferior a 5.5. Los ácidos orgánicos se utilizan principalmente como agentes micostáticos.

Sin embargo, a concentraciones elevadas, resultan muy eficaces frente a diversos microorganismos (incluidos los virus): por ejemplo, cuando sus concentraciones son superiores al 1% en frutas y productos fermentados con microorganismos, o cuando se acidifica hasta pH de 4,0 o valores inferiores. Los efectos observados en cultivos mixtos o en alimentos almacenados en los que un microorganismo ejerce un efecto sinérgico o antagónico sobre otro, se cree que, en muchos casos, se debe a la formación "in situ" de ácidos orgánicos como productos secundarios del crecimiento microbiano. La mayor parte de los ácidos orgánicos son muy poco eficaces como inhibidores del crecimiento microbiano a pH de 5,5-5,8 en los que crecen la totalidad de las bacterias causantes de toxinfecciones y la mayor parte de las causantes de alteración. Constituyen una excepción los ésteres del ácido paraludroxibenzoico, con un pKa = 8,5, que muestran actividad antimicrobiana a pH próximos a la neutralidad, y los ácidos propiónico y sórbico que también poseen cierta actividad a pH = 6,0 o 6,5.

Existen muchas publicaciones en la literatura científica y muchas patentes que atribuyen un espectro amplio de actividad antimicrobiana a una gran variedad de ácidos orgánicos de cadena recta ramificada, saturados o insaturados. Un cierto número de ácidos orgánicos saturados de cadena más larga son muy eficaces como inhibidores, tanto de las bacterias Gram positivas como Gram negativas, pero la actividad frente a las gram-negativas cae rápidamente en aquellos con más de ocho átomos de carbono.

La refrigeración aumenta la actividad bactericida de los ácidos nonanoicos y decanoicos frente a *Escherichia coli*. Los ácidos grasos no saturados de cadena larga son particularmente eficaces contra las células vegetativas de las bacterias Gram-positivas y evitan también la germinación de los esporos de las especies de *Bacillus*. Los cis-isómeros son más eficaces que los trans-isomeros y la actividad de un compuesto con determinado tamaño molecular aumenta con el grado de insaturación de la molécula. Por lo general, la utilización de ácidos orgánicos es compatible con la de otros conservadores o sistemas de conservación y de hecho muchas combinaciones poseen un efecto sinérgico. Por ejemplo, muestran mayor eficacia como inhibidores microbianos a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento y mayor como microbicidas a medida que la temperatura aumenta.

Determinados cationes pueden también aumentar de una manera significativa la eficacia de los ácidos orgánicos aumentando la solubilidad del ácido en la membrana de la célula microbiana. Algunos microorganismos parecen poseer un sistema de transporte de ácidos orgánicos desde la célula, que es inducible y funciona mediante un aporte energético, lo que permite su crecimiento en presencia de elevadas concentraciones de ácidos. La formación de peróxidos y otros productos resultantes de la oxidación de los ácidos grasos puede aumentar la eficacia antimicrobiana de ciertos ácidos grasos insaturados. Sin embargo, los ácidos orgánicos, al igual que la mayor parte de inhibidores microbianos, suelen ser más eficaces en condiciones anaeróbicas, que aeróbicas. Existen varias limitaciones al valor como inhibidores microbianos de los ácidos orgánicos en los alimentos:

- Suelen resultar ineficaces cuando los niveles iniciales de microorganismos son elevados.
- Muchos microorganismos utilizan los ácidos orgánicos como fuente metabolizable de productos carbonados.
- Existe una variabilidad inherente en cuanto a la resistencia de determinadas cepas.
- En determinadas condiciones de utilización, pueden resultar seleccionados tipos de microorganismos resistentes.

El ácido acético y sus sales son muy eficaces como acidificantes y conservadores y son muy utilizados para estos propósitos. Únicamente los *Acetobacter sp*., algunas bacterias lácticas y algunos mohos y levaduras muestran cierto grado de resistencia a este compuesto. La presencia de 1-2 % de ácido acético no disociado en carne, pescado, o vegetales suele inhibir o matar todos los microorganismos presentes, aunque, en condiciones normales de utilización, especialmente en malas condiciones higiénicas, pueden sobrevivir los microorganismos más acido tolerantes.

Los ácidos cítrico y láctico, tienen por lo general, solamente una actividad antimicrobiana moderada y excepto a bajos valores de pH, no resultan eficaces como inhibidores. Sin embargo, una concentración de ácido cítrico no disociado de 0,001 % inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en condiciones anaeróbicas. Tanto el ácido cítrico como el láctico parecen inhibir específicamente la formación de aflatoxinas.

Antibióticos y alimentos

Con respecto a los antibióticos, producidos por microorganismos o sintéticamente, inhiben a los microorganismos a grandes diluciones. Durante cierto tiempo se emplearon en los alimentos para inhibir las bacterias alterantes, pero por causas diversas los organismos encargados del control alimenticio prohíben ahora su adición a los alimentos. Incluso los pequeños residuos existentes en los alimentos procedentes de los animales tratados con antibióticos se consideran actualmente inaceptables. Los microorganismos de los alimentos pueden convertirse en antibiótico resistentes y colonizar el intestino del hombre y de los animales; sus residuos pueden asimismo ejercer una acción selectiva favoreciendo a la flora resistente ya existente en el intestino; en estas condiciones los antibióticos empleados terapéuticamente pueden resultar ineficaces. Una de las más importantes razones de la persistencia de bacterias resistentes es el empleo indiscriminado de medicamentos antimicrobianos en el hombre y en el ganado.

Los microorganismos antibiótico resistentes carecen de interés en los alimentos procesados térmicamente, debido a que, en general, hay que esperar que se destruyan durante el tratamiento; sin embargo, pueden encontrarse en los alimentos crudos y llevar a cabo la contaminación de otros alimentos. Como consecuencia del gran éxito terapéutico de los antibióticos en las enfermedades bacterianas, era natural que se ensayasen como conservadores frente al deterioro microbiano de los alimentos. Estos ensayos se realizaron entre 1945 y 1960 y la mayoría de los antibióticos se comprobaron en múltiples alimentos perecederos de todas las formas imaginables.

A medida que fue aumentando el miedo a los microorganismos antibiótico resistentes fue disminuyendo el empleo de los antibióticos como conservadores de los alimentos. Además, las industrias que procesaban carne de aves observaron el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos corrientemente utilizados; se seleccionaron fácilmente microorganismos alterantes muy antibiótico-resistentes. Por lo tanto, se vio muy pronto que el empleo corriente de antibióticos como conservadores alimenticios podía convertirlos en ineficaces debido a que se habían seleccionado floras alterantes antibiótico-resistentes.

Los dos antibióticos más importantes empleados en muchos países con fines conservadores alimenticios son la natamicina y la nisina, ninguno de los cuales se utiliza en terapéutica. La tilosina (un antibiótico macrólido), entre los antibióticos poco resistentes se emplea todavía como aditivo de los piensos. Este antibiótico ocupa una posición intermedia ya que se utiliza algo, principalmente en Japón, como conservador alimenticio; su empleo al parecer, ha sido abandonado.

La natamicina es un antibiótico macrólido originado por *Streptomyces natalensis*; su principal efecto es antifúngico y su empleo está permitido en ciertos países. In vitro inhibe el desarrollo de hongos productores de aflatoxinas en los cacahuetes crudos triturados. Ello constituye una ventaja considerable, lo que para algunos expertos sería suficiente para superar cualquier objeción acerca del empleo de este antibiótico en los alimentos. Hay varias publicaciones sobre el empleo de la natamicina para inhibir el desarrollo fúngico de los embutidos. Por ejemplo, con concentraciones de natamicina de unas 1000 ppm se conservaron bien, sin sufrir ataques fúngicos, embutidos holandeses. El antibiótico puede aplicarse con salmuera, baños o en forma de "spray" y el embutido puede incluirse en diferentes tipos de tripas. Este tratamiento determinó una concentración superficial de 2 ppm/cm^2 que se consideró que no tenía importancia toxicológica. Probablemente la aplicación más importante de la natamicina es para tratar la corteza del queso, tanto blando como duro, mediante la sumersión de aquél en baños, o rociándolo con suspensiones de 500 ppm de natamicina.

El

antibiótico puede detectarse en la corteza; su penetración varía de acuerdo con el tipo de queso. También se ha empleado la natamicina en las películas de envolver queso; su efecto conservador se pierde si se aplica después de desarrollado el micelio. Ciertos mohos, como *Aspergillus flavus*, producen enzimas en cantidad que inactivan la natamicina. La nisina es un antibiótico originado por estirpes de la bacteria que normalmente corta la leche, el *Streptococcus lactis*; se presenta naturalmente en la leche ácida y en el queso de granja por lo que es muy posible que desde que se domesticaron las vacas se hayan ingerido pequeñas cantidades de este antibiótico.

La nisina es un polipéptido que lo inactivan fácilmente los enzimas proteolíticos a pH = 8, por lo que es fácilmente digerido. El empleo de la nisina como conservador de alimentos "debería considerarse aceptable siendo la ingesta media diaria incondicional de 0 – 33.000 U/Kg de peso". Actualmente se elabora nisina en la URSS, Polonia y Reino Unido y su empleo está permitido en unos 20 países. La nisina posee un pequeño espectro antibacteriano afectando sólo a los gérmenes gram positivos.

Puesto que las bacterias gram negativas no son afectadas el empleo de la nisina como conservador de alimentos no puede contrarrestar a una mala higiene; su escaso espectro antibacteriano y su estabilidad ácida determinan unas condiciones de aplicación especiales. Sólo puede emplearse eficientemente cuando los microorganismos alterantes nisina sensibles son prácticamente los únicos presentes en el alimento. Este es el caso, por ejemplo, de los clostridios que originan hinchamiento en el queso suizo. No obstante, y por otras razones, este proceso apenas se utiliza en la práctica; el antibiótico es también termoestable especialmente en condiciones de acidez; de aquí que la nisina se pueda emplear como adyuvante del tratamiento térmico. El calor aplicado puede reducirse a sólo el necesario para destruir *Clostridium botulinum* que es el anaerobio esporulado más nisina-resistentes. Este menor tratamiento térmico mejora la calidad del producto alimenticio; además estos productos presentan mejores condiciones de almacenamiento, especialmente a temperaturas ambientales altas. En el proceso combinado calor-nisina, esta evita el desarrollo de las esporas que sobreviven al tratamiento térmico. Sin embargo, a las concentraciones corrientemente utilizadas, 100 U/g, la nisina no parece que sea esporicida; por lo tanto, el proceso debe planificarse de forma que quede suficiente cantidad de nisina después del tratamiento térmico y durante el almacenamiento para asegurar la continua inhibición del crecimiento de las esporas.

Cuando la legislación lo permite la nisina no sólo se emplea para prevenir el abombamiento de los botes sino también para conservar el queso procesado y el chocolate con leche. Otras industrias alimenticias la emplean para conservar guisantes, alubias en salsa y salsa kétchup. Pronto se puso de manifiesto la preocupación por el desarrollo de resistencia de la microflora de los animales a los que se suministraban antibióticos. No obstante, el aumento de la incidencia de microorganismos antibiótico-resistentes ha causado preocupación. La resistencia de tipo cromosómico es específica de un grupo de antibióticos relacionados entre sí. La resistencia múltiple se adquiere por transferencia desde un microorganismo resistente a otro sensible, de un elemento genético, llamado plásmido; existe independientemente del cromosoma bacteriano y en un mismo microorganismo puede haber uno o varios tipos diferentes de plásmidos. El relacionado con antibiótico – resistencia microbiana se ha llamado también factor de resistencia (factor R) y la bacteria que lo posee suele denominarse R^+.

Los plásmidos, como los cromosomas, se componen de moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA); los plásmidos R más grandes representan el 1 – 2 % de la información genética total de las bacterias. La transferencia puede tener lugar entre miembros de especies distintas; por ello los factores R son especialmente importantes en las enterobacterias en las que existe la posibilidad de que se transfiera antibiótico resistencia de un *Escherichia coli* no patógeno a una *Salmonella* patógena. Todos los géneros de enterobacterias pueden contener factores RR. También poseen plásmidos de resistencia *las pseudomonas y los estafilococos y estreptococos*. Es posible que tal transferencia de factores R ocurra en condiciones naturales entre las bacterias que pertenecen a la misma familia. Se admite ahora generalmente que la mayoría de las "resistencias" de las bacterias de tipo salvaje se deben a factores R y no son del tipo cromosómico.

Un informe de la OMS/WHO (Word Health Organización) a mediados de 1970, hace énfasis en que los beneficios del suministro de concentraciones bajas de antibióticos son demasiado grandes como para considerar su retirada del empleo ganadero. No obstante, dado que los antibióticos son indispensables para la terapéutica humana y animal, el citado informe los ha ordenado de acuerdo con su mayor peligro. La Comunidad Económica Europea (CEE) reconoció en la década de 1970 el riesgo de suministrar antibióticos que pudieran seleccionar los microorganismos resistentes que albergan plásmidos y desaconsejó el empleo como aditivos del pienso de tetraciclinas, estreptomicina y antibióticos relacionados con ellas. En la Unión Europea, nunca se han utilizado con fines nutritivos el cloranfenicol, polimixina, ampicilina, cefalosporinas, ni sulfamidas; sin embargo, algunas de éstas siguen utilizándose como coccidiostáticos en avicultura. Continúan los comentarios sobre si el empleo de los macrólidos, incluida la lincomicina, debería prohibirse en terapéutica animal y en los piensos; algunos antibióticos pueden excluirse de su empleo animal. Muchas personas que nunca se han tratado con antibióticos poseen *Escherichia Coli* aparentemente estable. Se han señalado que los plásmidos auto transferibles aislados de las enterobacterias del hombre y de los animales presentaban DNA con una gran homología, demostrando que estos plásmidos eran idénticos en todos sus aspectos importantes.

Envases y bacterias

El envasado preserva la calidad de los alimentos y los protege de los daños que pudieran producirse durante el almacenamiento, el transporte y la distribución. La protección ejercida puede ser de tres tipos:

- Química. El envasado puede impedir el paso del vapor de agua, del oxígeno y de otros gases, o actuar de forma selectiva, permitiendo sólo el pasó de algunos de los gases.
- Física. El envasado puede proteger de la luz, el polvo y la suciedad, de las pérdidas de peso y de los daños mecánicos.
- Biológica. El envasado puede impedir el acceso al alimento de microorganismos e insectos, afectar el modo o velocidad de la alteración, o la supervivencia y crecimiento de los gérmenes patógenos que pudiera haber en el alimento.

Los envases pueden ser rígidos (latas, papel, cartón, vidrio, plástico) o flexibles (plásticos, hoja de aluminio). Mediante diversas combinaciones de materiales y técnicas de procesado, es posible producir envases con cualquiera de las propiedades funcionales que se consideren deseables.

Los componentes e impurezas de los materiales de envasado y sus adhesivos, no deben poner en peligro la salud humana ni reaccionar con el alimento o adulterarlo. El material de envasado no debe contener microorganismos patógenos que puedan introducir un riesgo para el consumidor. Por ejemplo, la presencia de salmonellas en un material de envasado que vaya a usarse para un plato precocinado y congelado, sería inaceptable. Sin embargo, no habría razón para preocuparse excesivamente por la presencia de unos cuantos esporos de *Clostridium perfringens* en el material utilizado para envasar especias deshidratadas, porque, de cualquier manera, es fácil que existan esos mismos esporos en la misma especie.

Tampoco debe el material de envasado introducir cantidades importantes de microorganismos causantes de alteración. Se ha desarrollado un procedimiento que, mediante un sencillo chorro de vapor, sirve para descontaminar los recipientes empleados para cocer jamones. Muchos países imponen estándares microbiológicos para controlar la contaminación superficial de botellas y otros recipientes reutilizables; una contaminación superficial de sólo 10 microorganismos por 100 cm^2 equivale a "muy limpio". En papel sin tratar, se ha podido observar que predomina el género *Bacillus* y a veces los micrococos, a niveles normalmente inferiores a los 200/gramos, aunque a veces se llega hasta 2800/g; en otro estudio similar, se encontraron *mohos y levaduras* a niveles de hasta 10 por 100 cm^2.

En Estados Unidos, el papel para envasado de alimentos no debe sobrepasar los 250 organismos por gramo y los recipientes y tapas para leche, no más de uno por cm^2 (U.S. Department of Health, Education and Welfare). Se ha propuesto un método standard para la determinación del recuento de bacterias, mohos, levaduras y gérmenes coliformes en materiales de envasado no absorbentes. Los niveles de bacterias en la superficie de hojas de aluminio utilizadas para el envasado de alimentos, son aún menores. Los tubos y películas de plástico suelen tener entre 1 y 20 microorganismos por cada 1000 cm^2 y normalmente no llegan a los 10. En los vasitos de plástico, los valores encontrados son del mismo orden. Sin embargo, se observó que algunos de los microorganismos sobreviven incluso a la extrusión a 220ºC de los plásticos. A veces, se presta demasiada importancia a la contaminación microbiana aportada por el material de envasado; en general, los niveles de microorganismos contenidos en el producto son varios órdenes de magnitud mayores de los que existen en el material de envasado. Al no poder ser degradados por la acción microbiana, el poliestireno y otros plásticos, son más higiénicos que el papel prensado u otros derivados de la madera para el envasado de huevos.

Algunos plásticos tienen propiedades antibacterianas; es el caso de los que contienen alquido-barnices, resinas fenólicas, cloruro de polivinilo o poliacetal. Sin embargo, antes de escoger un material de envasado por sus propiedades antimicrobianas, conviene asegurarse de que no va a adulterar el alimento.

El material de envasado debe impedir la entrada de los microorganismos; las botellas, latas y la mayoría de las películas de plástico actualmente en el mercado, cumplen esta función. Se produce penetración cuando falla el sellado o se perfora el envase; por eso, el material ha de tener la suficiente resistencia mecánica como para impedir que se produzcan daños durante el procesado y la manipulación posterior. El mismo contenido puede también dañar el envase: es el caso de los huesos afilados de aves y otras carnes, y de las fibras de músculo o trozos de piel en alimentos muy desecados o ahumados. Una prueba biológica es lo mejor de determinar si una película resistirá a la penetración; se sumerge una porción estéril de un medio nutritivo empaquetada con el material en cuestión y sellada, en un baño que contenga el microorganismo concreto que interese (por ejemplo, *Enterobacter)* o una mezcla de microorganismos. La presencia de gas o la turbidez en el medio indicará que se ha producido penetración. Para el ensayo de laminados de plástico y aluminio resistentes al calor, la "prueba de ebullición en agar", en la que los envases se hierven durante 45 minutos en agar al 2 %. Antes de que se enfríe el agar, se añaden esporos de *Bacillus stearothermophilus* y durante el enfriado, el medio inoculado pasa a través de los puntos de penetración. Algunos microorganismos pueden atacar los materiales de envasado sintéticos y, en condiciones favorables, pueden atravesar una película no dañada previamente.

En algunos casos, se requiere una exposición prolongada a los enzimas bacterianos para que sea posible la entrada. Por ejemplo, los microorganismos productores de celulasa, sobre todo los mohos, no atraviesan las tripas de hidrato de celulosa de los embutidos, más que al cabo de mucho tiempo a temperaturas relativamente altas. Las películas de plástico tienen muy variada permeabilidad a los gases. La exclusión del oxígeno disminuye la velocidad de oxidación del producto, hace más lento el crecimiento de muchos tipos de bacterias y levaduras e impide el crecimiento de los microorganismos aerobios estrictos (como los mohos, por ejemplo).

La alta permeabilidad al oxígeno del poliestireno y las poliolefinas, puede ser reducida combinando estos polímeros con otros materiales mediante barnizado, encolado, recubrimiento o superposición con una capa del otro material o por coextrusión de ambos materiales. de forma análoga, se puede reducir la permeabilidad al vapor de agua de un material; la alta permeabilidad del hidrato de celulosa, por ejemplo, puede reducirse mediante barnizado. El factor más importante de la microbiología de los alimentos envasados es la permeabilidad relativa del material de envasado para el oxígeno, el dióxido de carbono y el vapor de agua, particularmente si los espacios con aire en el producto original han sido evacuados o rellenados con gases preservantes en el momento de cerrar el envase y, sobre todo, si se trata de productos perecederos, tales como aves, carnes y pescados.

Los envoltorios permeables al vapor de agua y a los gases, o más permeables al oxígeno que al dióxido de carbono y aquellos que no se ajustan a la superficie del producto, pueden evitar la entrada de microorganismos contaminantes, pero no afectan al crecimiento de los microorganismos que previamente se encontraban en el alimento. Las condiciones intrínsecas de un alimento envuelto en un material muy permeable, son similares a las del producto sin envolver. Por ejemplo, las películas de celulosa permeables al oxígeno no impiden que crezcan las Pseudomonas en la carne picada, mientras que las películas impermeables a los gases lo hacen imposible. Las películas de materiales que, como el polietileno, son impermeables a la humedad y permeables al oxígeno, sirven para proteger de la contaminación y de las pérdidas de agua, pero más que frenar, estimulan el crecimiento en superficie de la flora normalmente causante de alteración.

Atmósfera controlada o modificada

El crecimiento y la actividad de los microorganismos dentro de un envase depende de: a) la idoneidad del alimento como medio de cultivo, b) la temperatura, c) la aw, d) el pH, e) la naturaleza de los gases retenidos dentro del envase y f) la competencia entre microorganismos. Desde hace muchos años se sabe que diversos gases y vapores naturales, o artificialmente producidos, destruyen o inhiben a los microorganismos. Algunos de ellos se han estudiado para conocer su capacidad potencial de aumentar la vida útil de los alimentos. De estos, sólo se discutirán con detalle los que se han utilizado comercialmente: dióxido de carbono, óxido de etileno, óxido de propileno, dióxido de azufre y ozono. El nitrógeno y el oxígeno se utilizan con frecuencia en el envasado y almacenamiento de alimentos, pero su fin primario no es la inhibición de los microorganismos. El nitrógeno líquido, cuando se utiliza en los alimentos como un agente frigorífico, inhibe o destruye indirectamente a los microorganismos por congelación o refrigeración. El oxígeno se utiliza en atmósferas controladas para mantener el estado fisiológico de las frutas, hortalizas y verduras y el característico color rojo de la carne fresca, pero no se aplica con el fin de inhibir los microorganismos responsables de la alteración. Diversos gases son poderosos biocidas y se han utilizado con éxito en la desinfección de hospitales, establos y compartimentos de barcos o como fumigantes del suelo, pero no se han aplicado a los alimentos. Entre ellos están la ß – propiolactona, la clorpicrina, el gliceraldehído, el glutaraldehído y el ácido peracético.

El formaldehido se ha utilizado como fumigante en la desinfección de gallineros y huevos para incubadoras, pero igualmente no directamente para el control de los microorganismos en los alimentos. El formaldehido realmente ejerce una acción letal sobre los microorganismos de la carne y del pescado durante el ahumado, pero como el calor y la desecación están también implicados en el proceso, su contribución real a la inhibición de los microorganismos es desconocida. Tanto el monóxido de carbono como el acetaldehído son potencialmente útiles para su uso en los alimentos. Un uno por ciento de monóxido de carbono prolonga el color de la carne fresca y tiene un efecto inhibidor sobre las bacterias psicrotrofas, similar al del dióxido de carbono. Los vapores de acetaldehído al 0,5 % en la atmósfera inhiben, de una forma acusada, los mohos y levaduras aumentando el tiempo de conservación de las frutas, hortalizas y verduras. El dióxido de carbono, gas a las temperaturas normales de almacenamiento, es incoloro, inodoro e incombustible. No es tóxico para el hombre a concentraciones inferiores a un 10 % pero por encima de este nivel una exposición prolongada a la acción del mismo da lugar a la pérdida del sentido, lo que es importante tener en cuenta cuando se utilice a altas concentraciones en los grandes almacenes y vehículos de transporte. No deja residuos tóxicos ni su aplicación presenta serios problemas mecánicos.

Cuando se absorbe en los alimentos, el pH baja de acuerdo con la cantidad de ácido carbónico que se forma y con la capacidad tampón del alimento, pero de nuevo aumenta cuando el CO2 se elimina por exposición al aire o por un calentamiento suave del producto. El dióxido de carbono destruye, estimula, inhibe o no tiene efecto alguno de resaltar sobre los microorganismos, dependiendo de los microorganismos, de la concentración de dióxido de carbono, de la temperatura de incubación, de la edad de las células microbianas en el momento de aplicar el CO2 y de la actividad de agua del alimento o medio de cultivo. Por tanto, aunque la acción del CO2 sobre los microorganismos es selectiva, la mayoría de las levaduras, mohos y algunas bacterias son inhibidos por concentraciones comprendidas entre 5 y 50 % (viven la fase gaseosa) pero no son destruidos o inhibidos totalmente. Concentraciones inferiores a aquellas no tienen efecto alguno o realmente estimulan el crecimiento.

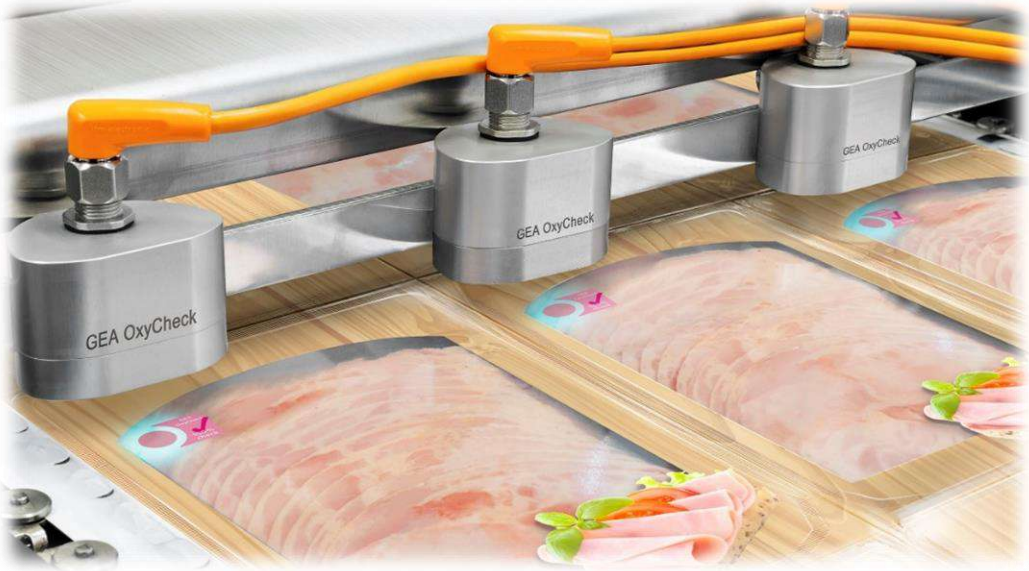
La inhibición aumenta de una forma casi lineal cuando se incrementa la concentración de CO2 desde un 5 % hasta el 25 - 50 %, dependiendo siempre del alimento y de la flora implicada. A concentraciones superiores a ésta el incremento de la inhibición es escaso o nulo. Aunque el grado de inhibición varía con los microorganismos y el alimento, con un 10 % se logra habitualmente una inhibición del orden del 50 % sobre la base del recuento total después de un determinado tiempo de incubación. El efecto inhibidor del CO2 sobre los microorganismos en los alimentos parece mayor a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento según se deduce del aumento relativo de la vida útil del alimento al descender la temperatura de almacenamiento.

Sin embargo, cuando los efectos de la temperatura y del CO2 se estudian por separado, se observa que la acción del CO2 se incrementa al aumentar la temperatura. El efecto inhibidor del CO2 se manifiesta, tanto en las bacterias como en los hongos, por un incremento de la fase de latencia y del tiempo de generación durante la fase logarítmica.

No obstante, a concentraciones comprendidas entre el 5 y el 20%, el efecto mayor se logra en la fase de latencia. La aplicación de gas una vez que las células microbianas han empezado a adaptarse al medio, o cuando ya están en la fase logarítmica, el efecto del CO2 se reduce sustancialmente. Por ejemplo, en estudios realizados con cepas psicrotrofas del género *Pseudomonas* y del grupo *Acinetobacter – Moraxella* se comprobó que si se retrasa la aplicación del CO2 (20 %) hasta 1 o 2 días después de la inoculación sobre la superficie de la carne, el efecto inhibidor es menor. Sin embargo, si la concentración de CO2 era del 40 % el momento en que se expone el producto a la atmósfera de CO2 tiene una influencia menor.

La velocidad de crecimiento en atmósfera de CO2 no aumenta con el tiempo, es decir, la inclinación de la curva de crecimiento no cambia. Esto indica que el sistema metabólico no se adapta durante la fase de exposición al CO2 ni existe, en este caso, una selección de los microorganismos CO2-resistentes. La reducción de la actividad de agua del medio aumenta el efecto inhibidor del CO2 sobre los microorganismos. El mecanismo de inhibición de los microorganismos por el CO2 no se conoce todavía con claridad. Sin embargo, ya en 1889 se observó que se debía a la presencia real de dióxido de carbono y no a la ausencia de oxígeno y que el efecto es reversible, ya que los microorganismos tratados recuperan la velocidad de crecimiento normal cuando se dejan de exponer a la atmósfera de CO2.

No obstante, en el caso de los microorganismos que alteran la carne, permanecen efectos inhibidores residuales cuando el gas se ha dejado de aplicar. El efecto directo del gas sobre las células microbianas se confirmó muchos años más tarde en experimentos realizados con *Pseudomonas aeruginosa*. El descenso del pH debido a la formación de ácido carbónico en el medio tiene un efecto perjudicial sobre ciertos microorganismos; por ejemplo, una atmósfera de CO2 al 20 % puede hacer bajar el pH, si el medio no está tamponado, en un valor de hasta una unidad de pH.



3. Deterioro de los alimentos

El deterioro o alteración de los alimentos comprende todo cambio que los convierte en inadecuados para el consumo y ello se debe a múltiples causas. A menudo es difícil señalar si un alimento está realmente alterado ya que varían las opiniones acerca de si un alimento es apto para el consumo o no. Tales diferencias de opinión son especialmente evidentes cuando se contemplan bajo un punto de vista mundial, como se deduce del bien conocido ejemplo siguiente. Los británicos prefieren la carne de caza que se deja «colgada» varios días para que sufra una serie de cambios organolépticos que favorecen la aparición de un «fuerte» aroma. Mientras los británicos consideran que esta carne es una delicia los ciudadanos de otros países, incluidos los estadounidenses, la consideran alterada e inaceptable. La alteración de los alimentos puede deberse a:

- Ataque de insectos.
- Lesiones físicas por golpes, presiones, heladas, deshidratación y radiación.
- Actividad de enzimas tisulares autóctonas, tanto vegetales como animales. Si tales enzimas no se destruyen, continúan actuando durante el procesado y almacenamiento. Así las peroxidasas, que se encuentran naturalmente en las hortalizas verdes, pueden originar olores y sabores extraños durante el almacenamiento.
- Cambios químicos no producidos por los microorganismos ni por las enzimas autóctonas. En estos cambios generalmente está implicado el oxígeno y prescindiendo del deterioro por microorganismos, son la causa de alteración más frecuente. Como ejemplos de deterioro químico citaremos la rancidez oxidativa de las grasas y aceites y los colores extraños de las carnes curadas.
- Actividad de los microorganismos, sobre todo bacterias, levaduras y mohos.

La alteración originada por los microorganismos es, sin ninguna duda, la más importante de las citadas y en este módulo le prestaremos especial atención. Basándose en la sensibilidad de los alimentos a la alteración, pueden clasificarse como estables o no alterables (por ej., la harina), semialterables (por ej., las manzanas) y alterables (por ej., carnes curadas). La inclusión de un alimento dado en uno de estos grupos depende de muchos factores interrelacionados. Así la harina de trigo o de maíz, es intrínsecamente un alimento estable debido a su baja Aw (actividad de agua), pero un almacenamiento deficiente que facilite la absorción de humedad, la convierte en un producto alterable. Al estudiar la alteración de los alimentos crudos, debe asumirse que en el alimento hay inicialmente una gran variedad de microorganismos y que, cuando se inicia el crecimiento microbiano, algunas especies se encuentran con unas condiciones más favorables que otras y, en consecuencia, aquéllas sobrepasarán en desarrollo a las últimas.

De hecho, el crecimiento competitivo de las estirpes favorecidas, generalmente se traduce en el predominio de una o dos cepas, que se convierten en la flora más abundante y en la responsable de la alteración observada. De aquí que, aunque en un tipo dado de alimento, los microorganismos deteriorantes representen sólo una parte muy pequeña de la flora inicial, se convierten en los predominantes bajo una serie de condiciones de almacenamiento especificas; como resultado en un alimento concreto y bajo unas condiciones de almacenamiento determinadas puede predecirse, el tipo específico de alteración microbiana que aparecerá. En este momento debe señalarse, sin embargo, que la especie microbiana predominante en el momento de la alteración no siempre es la responsable de la última; por ejemplo, en el pescado se ha observado que las especies auténticamente «alterantes» sólo suponen el 30 % de la flora total en el momento del deterioro.

RECUERDE: El adecuado almacenamiento del alimento, impedirá su deterioro

Aunque los tipos predominantes y los «alterantes» pueden estar muy próximos taxonómicamente (esto es, pertenecer al mismo género e incluso a la misma especie), sólo los últimos inducen los cambios químicos asociados a la alteración. La extensión del cambio químico producido por una sola célula microbiana es muy pequeña, de forma que las alteraciones detectables por medios químicos ortodoxos sólo pueden producirlos las poblaciones microbianas que alcancen la máxima densidad posible. Para inducir una alteración, detectable varios días en los alimentos, se necesitan unas 10^8 bacterias por gramo y el deterioro producido, cuando el número de bacterias es bastante menor que el citado, no tiene un origen bacteriano. Las poblaciones microbianas de los alimentos y en particular las bacterianas, rara vez superan unas 10^{10} células por gramo, por lo que puede inferirse que los microorganismos responsables de la alteración, aunque no siempre predominen, es muy fácil que representen una parte importante de la flora cuando esté avanzado el deterioro. Lo antedicho se refiere fundamentalmente a la alteración de los alimentos crudos. Los procesados por calentamiento sufren unos tipos de deterioro especiales debidos a la acción selectiva del calor en los microorganismos del alimento. Ni que decir tiene que la intensidad de la selección microbiana dependerá del tiempo y de la temperatura a que se calentaron los alimentos; cuanto más drástico haya sido el tratamiento, tanto menores serán el número y la variedad de microorganismos sobrevivientes. Por lo tanto, la alteración de los alimentos enlatados puede deberse a un solo microorganismo resistente a las condiciones de procesado; se trata corrientemente de una bacteria productora de esporas muy termorresistente.

Alteraciones en carnes frescas y curadas

En la superficie externa y en el tracto intestinal de los ganados vacuno, lanar y porcino hay ya, antes del sacrificio, un gran número y una gran variedad de microorganismos. En la piel de los bóvidos son corrientes los recuentos que superan los 10^5 microorganismos por cm^2 y en los cerdos sin lavar y en la lana de las ovejas se han alcanzado recuentos sustancialmente mayores (unos 10^8 por cm^2). Sin embargo, se admite que el tejido muscular subyacente es normalmente estéril, salvo en los animales infectados. El sacrificio de los animales con pistola de bala cautiva y las operaciones subsiguientes, como degollación, desollado, evisceración y despiece, comunes a todos los animales, originan la contaminación de los tejidos subyacentes que antes eran estériles (las ovejas y los cerdos ordinariamente sufren el aturdimiento eléctrico, que no implica contaminación microbiana). Obviamente será la superficie de corte del músculo recién hecha, la que albergará la mayoría de los microorganismos contaminantes, pero el tejido profundo con el tiempo se contamina a partir del aporte de la sangre de las vísceras. Los recuentos bacterianos totales de las superficies de corte de los músculos corrientemente varían entre 10^3 y 10^5 microorganismos por cm^2, que proceden principalmente del exterior y del intestino del animal y también de los cuchillos, otros utensilios, mesas de carnización, etc., por lo que a menudo las variaciones de los recuentos reflejan las condiciones higiénicas del frigorífico faenador. La carne constituye un medio ideal para el crecimiento de microorganismos, especialmente bacterias, por lo que, salvo un control eficaz, debe esperarse un rápido desarrollo. El número de microorganismos de la carne puede controlarse con una serie de medidas que se estudian brevemente a continuación.

Debe hacerse constar que la mayoría de los estudios sobre alteración de la carne se han realizado con la de vacuno, pero las características de la alteración son esencialmente iguales en lanares, cerdos y otras especies de abasto. Como se verá más adelante, la aparición de olores anormales y otras características de la alteración de las carnes, se asocian con un nivel particular de bacterias. Puesto que la velocidad de crecimiento bacteriano en las carnes, a una temperatura dada, sigue un curso conocido, cuanto menor sea la contaminación inicial de la carne más tiempo se requerirá para que la flora bacteriana alcance los niveles alterativos. Así, en la carne de vacuno almacenada a 5 ºC, si el recuento inicial supera los 10^5 microorganismos por cm^2, la alteración se detecta dentro de los 6 días, mientras que si es de 10^3 por cm^2 no tendrá lugar hasta el 10º u 11º día. Puesto que la mayoría de los microorganismos de las canales proceden probablemente de la piel, los animales que lleguen al matadero, antes de su sacrificio deberían liberarse de la suciedad que lleven adherida.

Aún puede reducirse más la carga microbiana de los animales recién sacrificados, rociando las canales con agua caliente y ejerciendo en el matadero un riguroso programa sanitario que incluya una limpieza completa de paredes, suelos, mesas de carnización, cuchillos y otros utensilios, ropas de los operarios, etc. Cuando se sacrifican los animales, el glucógeno almacenado en sus músculos se convierte en ácido láctico. En condiciones normales ello determina una caída del pH muscular de aproximadamente 7 a 5,6, lo que tiene una gran importancia ya que determina una disminución de la velocidad de crecimiento de las bacterias contaminantes.

Sin embargo, si el animal padeció estrés antes del sacrificio (por ej., debido a excitación, fatiga o hambre) las reservas de glucógeno se agotan, con lo que se produce una cantidad escasa de ácido láctico y el pH final o último de la carne se aproxima a la neutralidad; en estas condiciones la carne se altera más rápidamente, por lo que, inmediatamente antes del sacrificio, los animales deben estar en buenas condiciones fisiológicas. Después del sacrificio el oxígeno almacenado en los músculos se agota, con lo que el potencial redox (POR) cae hasta niveles muy bajos. La gran capacidad reductora del medio junto con una temperatura inicial alta (38º C) crean un ambiente ideal para el crecimiento de las bacterias anaerobias. Las bacterias alterantes que predominan son los *Clostridium sp*., que crecen en la profundidad y no en la superficie de las carnes, degradando los tejidos y originando sustancias malolientes como ácido sulfhídrico y amoníaco. Este proceso, conocido como putrefacción, debe evitarse enfriando rápidamente la carne antes de que el POR baje lo suficiente para permitir el crecimiento de tales microorganismos. Por otra parte, se admite actualmente, que la presencia en gran número de ciertos anaerobios de la putrefacción, puede ser causa de toxiinfección alimentaria. Uno de los microorganismos predominantes en las fases iniciales de la putrefacción es *C. perfringens*, habiéndose aislado en ocasiones *C. botulinum* a partir de carnes en putrefacción.

El rápido enfriamiento de la carne, inmediatamente después del faenado, también es conveniente para disminuir el crecimiento de otras bacterias productoras de toxiinfecciones alimentarias, como *Salmonella sp*, que también son contaminantes frecuentes. De lo expuesto se deduce que el rápido enfriamiento de las canales es imprescindible para disminuir el crecimiento bacteriano inicial y para aumentar el período de almacenamiento potencial. Las temperaturas de almacenamiento ejercen un efecto manifiesto en el tipo de alteración microbiana, aspecto que estudiamos ahora con cierto detalle.

RECUERDE: Una baja temperatura de almacenamiento reducirá la carga bacteriana a futuro

Como ya se ha indicado, las canales y piezas cárnicas mantenidas a temperaturas de 20 ºC o mayores sufren inevitablemente putrefacción. Sin embargo, si por el picado o fileteado aumenta la relación área superficial/volumen, el POR de la carne cruda también aumenta, creándose así condiciones menos favorables para el desarrollo de los anaerobios de la putrefacción. En estas condiciones el crecimiento en la superficie de la carne es muy rápido, y el POR aumentado permite que se desarrolle una flora microbiana miscelánea. La carga microbiana en el momento de la alteración todavía contiene *Clostridios*, pero los que ahora predominan son los bacilos mesófilos, anaerobios facultativos y Gram negativos. La mayoría de ellos son de origen entérico y comprenden los géneros: *Escherichia, Aeromonas, Proteus y Enterobacter*.

Otros géneros que también están representados son: *Staphylococcus y Micrococcus* (cocos Gram positivos) y *Bacillus* (bacterias esporuladas aerobias y anaerobias facultativas). A 20ºC la carne fresca en filetes o picada se altera pronto y alcanza su recuento máximo en 3 – 4 días. Los primeros síntomas de alteración (olores anormales) se detectan en los dos primeros días y la presencia de limo o viscosidad se observa a los 3 días.

Debe hacerse notar que, cualquiera que sea la temperatura de almacenamiento, la producción de olores extraños y de viscosidad acaecen cuando los recuentos totales alcanzan los 10^7 y los 10^8 microorganismos cm^2 y g respectivamente; de hecho, esta relación sirve para las carnes en general. Los potenciales OR altos de las carnes picadas y fileteadas favorecen más a los microorganismos proteolíticos que a los putridógenos. Los olores anormales originados se designan corrientemente como «agrios» y se deben a la formación de ácidos volátiles, como el fórmico y el acético; el limo superficial es consecuencia del gran desarrollo bacteriano y del ablandamiento de las proteínas estructurales de la carne.

La naturaleza de los cambios bioquímicos que acaecen a estas altas temperaturas ha sido poco estudiada, habiéndose trabajado mucho más en los cambios que tienen lugar a las temperaturas de refrigeración utilizadas comercialmente. Al descender las temperaturas de almacenamiento por debajo de los 20 ºC, las bacterias mesófilas son sobrepasadas en crecimiento por las psicrótrofas, si bien hay una pequeña proporción de las primeras que todavía crecen a 5 ºC. las carnes fileteadas y picadas mantenidas a 15 – 10 ºC desarrollan olores extraños después de 4 – 5 días de almacenamiento y la formación de limo es evidente a los 7 días aproximadamente; la flora microbiana va siendo progresivamente dominada por *Pseudomonas sp.* que representa sobre el 95 % de la flora total en el momento de la alteración. A temperaturas de 5 ºC y menores se observa una fase de latencia manifiesta. Su duración depende de la temperatura de almacenamiento y viene a ser de unas 24 h a 5 ºC y de 2 – 3 días a 0 ºC. Además, a temperaturas próximas a 0 ºC se aprecia una caída inicial del número de bacterias viables que se debe, probablemente, a la muerte o lesión de muchos tipos de bacterias a estas bajas temperaturas. A medida que la temperatura se aproxima a los 0 ºC, el crecimiento bacteriano, una vez iniciado, es mucho más lento y cada vez son menos los tipos que pueden crecer. Por lo tanto, el período, previo a la aparición de los primeros signos de alteración, se alarga y la producción de olores anormales y de limo ocurren a 5 ºC aproximadamente a los 8 y 12 días respectivamente y a 0 ºC a los 16 y 22 días.

Cualitativamente la flora alterativa está dominada también por *Pseudomonas sp*., en los últimos estadios, debido a que crecen a estas temperaturas más rápidamente que todas las demás especies competidoras. Por otra parte, los verdaderos mesófilos sólo representan en este momento una fracción pequeña de la flora total, pero dado que durante el almacenamiento aumenta el número de bacterias que se observan en los medios incubados a 37 ºC, ello indica que algunos tipos mesofílicos deben desarrollarse en las carnes mantenidas a 5 ºC. Debido al carácter netamente aerobio de *Pseudomonas spp*, el crecimiento se limita a la superficie y a unos 3 – 4 mm de profundidad en los tejidos subyacentes. Por lo tanto, el tipo de alteración es en gran parte independiente del tamaño del corte o pieza de carne y la alteración de las canales es lógico que se limite a las porciones superficiales; el crecimiento de los clostridios se inhibe a estas bajas temperaturas y por lo tanto no tiene lugar la putrefacción. Bajo condiciones de almacenamiento normales la humedad de las canales es alta y sus superficies permanecen húmedas. Cuando el almacenamiento se prolonga, o cuando bajan los niveles de humedad, se intensifica la desecación de las capas superficiales y consecuentemente baja la Aw que favorece el crecimiento fúngico.

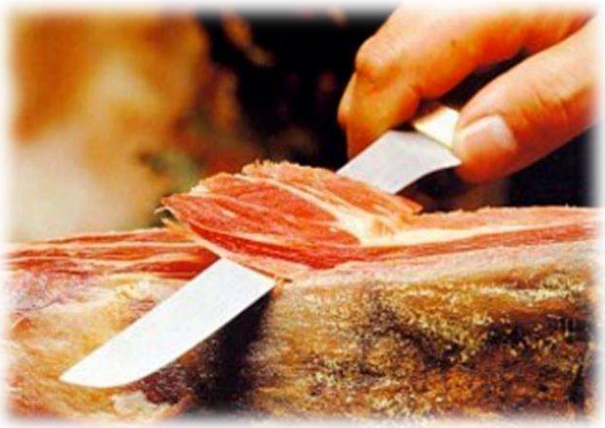
Cuando se favorece de esta manera el crecimiento de los hongos, se localiza principalmente y sólo afecta a las porciones más superficiales, por lo que puede expurgarse sin ningún peligro para el resto de la carne. La alteración debida al crecimiento de mohos presenta varias formas:

- «Florecido» o «barbillas»: miembros de los géneros *Mucor; Rhizopus y Thamnidium* producen micelios de aspecto algodonoso, de color blanco a gris, en la superficie de las canales.
- «Manchas negras»: por *Cladosporium herbarum y C. cladosporoides* que crecen en una gran variedad de carnes incluso a temperaturas tan bajas como los -5 ºC. Originan manchas negras debido al desarrollo de micelio muy obscuro.
- *Penicillium sp. y Cladosporium sp*. cuando crecen en la carne producen gran número de esporas de color amarillo a verde: en la carne originan manchas del mismo color.
- «Manchas blancas»: generalmente se deben al crecimiento de *Sporotrichum carnis.*

Al estudiar los cambios químicos que ocurren durante la alteración a bajas temperaturas deben diferenciarse entre los cambios inducidos por las enzimas naturales presentes en los tejidos animales y los debidos a las enzimas bacterianas. De hecho, esta diferenciación es difícil, por ello hasta los años ‘70 no se comprendieron bien los originados por las bacterias como tales. En los aminoácidos de las carnes almacenadas acaecen cambios que se deben a cualquiera de estas series de enzimas. Inicialmente las bacterias atacan a la glucosa, a los aminoácidos y a otros compuestos de bajo peso molecular, como los nucleótidos, más que a las proteínas de la carne. Estos cambios se acompañan de un marcado aumento del pH, desde aproximadamente 5,6 hasta incluso 8,5, debido fundamentalmente a la formación de amoniaco por degradación bacteriana de los aminoácidos; en consecuencia, los valores del pH se han utilizado para establecer la capacidad de conservación de la carne.

La proteólisis, es decir, la escisión de las proteínas de la carne, sólo tiene lugar en los últimos estadios de almacenamiento y únicamente se observa cuando aparecen otros signos alterativos. La degradación de las proteínas se debe a la actividad de las proteasas bacterianas y se nota primero cerca de la superficie de la carne; sin embargo, con el tiempo estos enzimas penetran más profundamente en los tejidos. Las pseudomonas son las principales responsables de la proteólisis que acaece cuando su número supera las 10^9 por cm^2. Como resultado del desarrollo microbiano se producen grandes cantidades de compuestos volátiles; de ellos, acetona, metil-etil-cetona, dimetil-sulfuro y dimetil-disulfuro, son probablemente los que mejor se relacionan con la intensidad de la alteración.

Muchas *pseudomonas* son también productoras activas de lipasa a bajas temperaturas y por lo tanto están con frecuencia implicadas en la hidrólisis de las grasas, proceso que da lugar a la producción de aromas repugnantes como consecuencia de la formación de ácidos grasos. Las bacterias alterantes también producen lipoxidasas que aceleran la oxidación de los ácidos insaturados a aldehídos y de esta forma contribuyen al problema conocido como «rancidez oxidativa». La rancidez oxidativa se produce normalmente por una incorporación lenta de oxígeno y no es de origen microbiano. Se sabe, sin embargo, que la alteración bacteriana de la superficie de los tejidos grasos de la carne fresca sigue un curso similar al de la degradación proteica y de nuevo el ataque de las bacterias a los lípidos tiene lugar cuando la alteración está muy avanzada. Con respecto a las carnes curadas, los ingredientes principales de las sales del proceso de curado son sal y nitrato y/o nitrito sódico. La sal se incorpora como agente conservador que actúa disminuyendo la aw de la carne. *Pseudomonas sp*., de importancia en la alteración de las carnes refrigeradas, es muy sensible a la disminución de la aw y a ella se debe, en parte, la relativa estabilidad de las carnes curadas. El papel del nitrato en el control de la alteración no está claro, si bien es muy útil para el desarrollo del color rojo de estas carnes, siendo reducido a nitrito por las bacterias.



El nitrito, además de colaborar al color de la carne, ejerce un papel principal al prevenir la germinación y el crecimiento de las esporas. El nitrito *per se* no es muy activo, pero su eficacia la refuerzan ciertos factores como concentración de sal, pH y temperatura de almacenamiento, todos los cuales son importantes en la estabilidad de las carnes curadas. El curado puede llevarse a cabo por uno de los tres procedimientos siguientes: en el primero, **curado en seco**, los agentes del curado se aplican por frotación a la superficie de la carne, mientras que, en el segundo, **salmuerado**, las carnes se sumergen en una salmuera de los agentes del curado. En ambos métodos las carnes se mantienen a 3 – 4 ºC hasta que los agentes penetran en el centro de las piezas. Estas bajas temperaturas disminuyen las posibilidades de crecimiento de los anaerobios de la putrefacción, pero pueden surgir problemas de alteración debido a una lenta penetración de la salmuera.

Estos problemas se superan en gran parte en el tercer procedimiento, **salmuerado por inyección**, introducido en los últimos años. En este procedimiento la salmuera se inyecta en los tejidos más profundos mediante agujas largas, dotadas de varios orificios en toda su longitud, que se disponen en filas, de forma que tienen lugar a la vez varios cientos de inyecciones separadas. Una variedad de esta técnica consiste en bombear la salmuera por el sistema vascular que la canaliza a las distintas regiones orgánicas. En ambos procedimientos, las carnes se someten posteriormente a inmersión en salmuera.

En 1983 y para aumentar la vida útil del bacon, se desarrolló una técnica de **salado en seco** en la que las semicanales para bacon se hacían pasar por una nube de sal en polvo después de sacarlas de la salmuera de curado. Las salmueras empleadas en el curado del bacon contienen corrientemente 20 – 27 % de sal que ejerce un profundo efecto en los tipos de microorganismos existentes. La flora predominante de una salmuera típica de curado, está dominada por los *micrococos* que toleran la baja aw del entorno. Durante el curado estos microorganismos se convierten también en los predominantes en las semicanales, por lo que la flora normal heterogénea de las carnes frescas es en gran parte sustituida por este grupo. Los *Micrococcus sp*., además de crecer en medios de cultivo con 20 % de NaCl, son psicrótrofos y se desarrollan a 4 ºC. Otra de sus importantes características es su capacidad de reducir los nitratos a nitritos y por lo tanto juegan un papel importante en parte del proceso de curado.

Terminada la curación, que dura de 4 a 14 días, las semicanales de bacon se escurren y se dejan madurar otros 5 – 10 días a 4 ºC; durante estos procesos tiene lugar una disminución gradual de la concentración de sal del bacon hasta niveles bien por debajo del 10 %. De hecho, el bacon con mayores concentraciones salinas es el que tiene una concentración final de sal >5 %; al final de la maduración los recuentos bacterianos varían entre 10^4 y 10^6 por cm^2, y aunque se mantiene el predominio de los *micrococos* (>60 %), aumenta la proporción de bacterias Gram negativas, en especial *Acinetobacter y Vibrio sp*.

Durante el almacenamiento subsiguiente del bacon aumenta gradualmente el número de bacterias hasta un máximo de aproximadamente 10^8 microorganismos por cm^2, después de 2-3 semanas a 10 ºC. En este momento la flora se compone de proporciones, aproximadamente iguales, de los géneros *Micrococcus, Vibrio y Acinetobacter*, aunque si el bacon se mantiene en condiciones de frío los vibrios predominan, sobre todo en la superficie. El gran recuento de la superficie de una semicanal de bacon se asocia a la formación de limo y generalmente se debe a *vibrios* halófilos, pero no habrá deterioro manifiesto alguno de la calidad del bacon dado que los cambios en el interior de la carne son normalmente mínimos. Uno de tales cambios es el llamado “hueso hediondo” que se debe principalmente *a vibrios y micrococos*. Se caracteriza por un olor desagradable que se aprecia al deshuesar el bacon; se debe a un mal curado o al empleo de carnes con un pH demasiado alto.

Cuando eventualmente tiene lugar el deterioro, generalmente se debe a *micrococos y vibrios*, junto con diversas *levaduras y mohos*, incluidos respectivamente *Torulopsis sp. y Aspergillus sp*. Los olores y sabores repugnantes generalmente se asocian más a la grasa que a la carne magra, si bien en la última los micrococos pueden producir cambios proteolíticos. La hidrólisis de las grasas se debe a las lipasas bacterianas y tisulares, mientras que la rancidez oxidativa origina el amarilleamiento de la grasa.

El ahumado, por su parte, además de proporcionar un aroma y color apetecibles, también contribuye a la conservación del producto. Su efecto es a la vez bacteriostático (es decir, frena el crecimiento bacteriano) y bactericida (destruye las bacterias) si bien los mohos también se afectan en cierto grado. El humo actúa de dos formas: primero, al desecar la superficie disminuye más la aw y acentúa los efectos de la sal; segundo, impregna los tejidos de conservantes químicos como el formaldehido y los fenoles que inhiben el desarrollo microbiano. Además, durante el proceso de ahumado se destruye un gran número de bacterias del bacon, dependiendo del tiempo y tipo de ahumado. *Micrococos, levaduras y mohos* son los más frecuentemente aislados del bacon, si bien cuando se utiliza el humo líquido, las *bacterias lácticas* serán las que predominarán. Puesto que estas bacterias originan una alteración agria, menos ofensiva que la producida por los *micrococos* y en una fase más tardía, se prolonga así la vida útil del producto. Los procesos de curado de los jamones son iguales a los del bacon, salvo que frecuentemente se adiciona azúcar con las sustancias de curado. Puede ser atacado por bacterias, en especial *lactobacilos,* y sus fermentaciones dan lugar a diversos tipos de acidez; no obstante, se ha sugerido que los *lactobacilos* son útiles para mantener la estabilidad de las salmueras al evitar el excesivo aumento del pH. En general los microorganismos encontrados en los jamones son iguales a los del bacon y su flora se compone principalmente de *micrococos, estreptococos y lactobacilos*, en proporciones que dependen de la concentración de sal y del tiempo en almacén. Los jamones con mayores concentraciones de sal también soportan el crecimiento de una mayor proporción de levaduras y posiblemente de mohos.

Para envasar productos al vacío, los materiales utilizados por la industria alimentaria varían desde los muy impermeables, necesarios para el envasado al vacío, a los muy permeables y desde los opacos a los transparentes. Sus materiales están constituidos o por componentes simples, como el polietileno (politeno) y el cloruro de polivinilo (PVC), o por componentes múltiples. En el último caso los materiales están formados por capas de distintos productos para conseguir las características de envasado más convenientes. Películas constituidas por nitrocelulosa y cera se aplican a uno o a los dos lados de una lámina sencilla, como la celulosa; alternativamente pueden fabricarse multicapas utilizando, por ejemplo, etilen-vinil-acetato con dos capas de PVC (Cryovac).

Desde el punto de vista microbiológico las propiedades fundamentales de los materiales de envasado son su permeabilidad al vapor de agua y a ciertos gases, incluido el oxígeno. La permeabilidad al vapor de agua varía de acuerdo con el material de envasado. Las carnes frescas generalmente se envasan en películas permeables al oxígeno con el fin de conservar el color rojo brillante de la mioglobina oxigenada. Por el contrario, las carnes curadas se envasan en películas impermeables al oxígeno para prevenir que empalidezca el color como consecuencia de la oxidación. En los últimos años se ha estudiado la posibilidad de distribuir la carne fresca de vacuno en forma de cortes primarios refrigerados y envasados al vacío, en vez de en canales, método que se está popularizando debido a que mejora su vida útil; otra ventaja adicional es que disminuyen las pérdidas de peso debidas a la desecación superficial.

El envasado al vacío también se está popularizando cada vez más en el comercio, a pesar de que se ha criticado, con justicia, por las pérdidas de color; esto se compensa por la mayor vida útil de la carne y por la rápida regeneración del color rojo normal que tiene lugar al abrir el envase o al reempaquetar la carne en una película permeable al oxígeno. La disponibilidad de oxígeno en el interior del envase ejerce cierta influencia en la flora microbiana: la carne, como muchos microorganismos, tiene una gran demanda de oxígeno, por lo que los niveles del mismo se agotan rápidamente en los envases más impermeables sin necesidad de hacer el vacío.

A la vez aumentan las concentraciones de dióxido de carbono (CO_2) de estos envases a una velocidad que depende de la permeabilidad de la película. Sin embargo, los materiales de envasado son más permeables al CO_2 que al oxígeno, por lo que una película poco permeable puede impedir la salida del oxígeno, dejando escapar el CO_2 y manteniendo el vacío del envase. Aumentar las concentraciones de CO_2 en el envase tiene sus ventajas, ya que es inhibidor frente a muchos microorganismos, incluidos *mohos y pseudomonas*, grupo el último que constituye la flora dominante de las carnes frescas alteradas. Las *bacterias lácticas* y las *levaduras* son mucho más resistentes a niveles altos de CO_2 por lo que es de esperar que aparezcan en la alteración característica de las carnes envasadas. Otro factor que afecta al tipo de alteración microbiana es la aw que, lógicamente, es alta en los envases de película impermeable. Puesto que el envase no pierde agua, el desarrollo microbiano no se ve frenado por la caída de la aw, sin embargo, en el interior del envase sus efectos se subordinan a los del dióxido de carbono y del oxígeno. Cuando la carne envasada se almacena a temperaturas cálidas experimenta los cambios putrefactivos corrientes.

Por ello esta carne se almacena siempre a temperaturas de refrigeración; sólo se estudiará la carne así almacenada. El crecimiento de los microorganismos de las carnes frescas envasadas a vacío, almacenadas a 3-5 ºC, se retrasa observándose corrientemente un período de latencia de 3 a 5 días.

El crecimiento subsiguiente es lento y continúa aproximadamente 10 días, transcurridos los cuales el recuento total viene a ser de 10^7 microorganismos/cm^2 (o por gramo en la carne picada); esto supone aproximadamente el 1 % del alcanzado en películas permeables. Cualitativamente la flora microbiana del envase impermeable está dominada por las *bacterias lácticas* (sobre todo *lactobacilos y leuconostoc*) que al final del almacenamiento representan el 50-90 % de la flora total. Esto refleja su característica resistencia al acúmulo de dióxido de carbono y su capacidad de crecer en condiciones anaerobias. Las bacterias lácticas atacan preferentemente a los carbohidratos, pero debido a la escasa concentración de éstos en la carne, es relativamente poco el ácido formado y en consecuencia la caída del pH no es muy marcada. Esto significa que incluso cuando es máxima la densidad de estos microorganismos, la alteración observada es poco manifiesta y se asocia a olores amargos o a queso rancio, debido a la formación de ácidos grasos, entre los que sobresalen el acético y el butírico.

Al aumentar la permeabilidad de la película del envase, la flora alterativa cambia gradualmente a otra formada por una gran proporción de *pseudomonas*; por lo tanto, los cambios alterativos son los típicos de la carne fresca sin envasar. Las proporciones relativas de *pseudomonadales, bacterias lácticas* y otros grupos, menos significativos, dependen principalmente de la concentración de dióxido de carbono en el envase. Entre los grupos nuevos significativos hay una bacteria, *Brochothrix thermosphacta* (antes *Microbacterium thermosphactum*) que es un bacilo pequeño, Gram positivo e inmóvil. Como las pseudomonas, disminuye en los envases impermeables, pero en los permeables a veces representa el 20-30 % de la flora alterante total.

Contrariamente a las *pseudomonas, B. thermosphacta* no se afecta por la presencia de dióxido de carbono y corrientemente alcanza recuentos altos en la carne de cordero y de cerdo, sobre todo cuando se envasan en películas de permeabilidad intermedia, cuyos envases acumulan algo de dióxido de carbono si bien contienen todavía niveles bajos de oxígeno. Para prolongar la vida de almacén de la carne envasada en películas impermeables se les ha incorporado conscientemente dióxido de carbono y los problemas de pérdida de color se han minimizado con el empleo de mezclas de CO_2:O_2. En este principio se basa el **envasado en atmósferas controladas** (CAP), existiendo pruebas que indican que a las concentraciones utilizadas (por ej., 40 % de CO2 y 60 % de O2), la mezcla resulta inhibidora para los microorganismos, si bien en los últimos estadíos predominan las bacterias lácticas. Otras mezclas a base de dióxido de carbono y nitrógeno (por ej., 20 % de CO2 y 80 % de N2) también prolongan la vida de almacén de estas carnes.

Como se ha dicho más atrás, los *micrococos* son los principales tipos de bacterias que se desarrollan a las concentraciones salinas del bacon o del jamón crudo, cuando se almacena a temperatura ambiente (unos 20 ºC). Cuando este bacon se almacena envasado al vacío, los *micrococos* siguen predominando y su número alcanza unos 10^7 por gramo en aproximadamente 9 días de almacenamiento. En torno a las 2 semanas la alteración es evidente, caracterizándose por un olor rancio. En el bacon de menor concentración salina la flora inicial es más variada y los recuentos máximos se alcanzan también en torno a los 9 días observándose la alteración unos pocos días después.

En estas circunstancias la flora microbiana se compone de proporciones aproximadamente iguales, de *micrococos, estreptococos* (esto es *enterococos*) y otras bacterias lácticas (*lactobacilos y leuconostoc*); a temperaturas de almacenamiento altas (por ej., 25 ºC) las bacterias Gram negativas (por ej., *Vibrio sp. y Proteus sp*.) son las responsables de la putrefacción. Una de las ventajas del almacenamiento en frío, es que se requieren de 3 – 4 semanas para que el recuento microbiano alcance el máximo y por lo tanto la alteración se retrasa hasta 5 semanas. Los cambios cualitativos de la microflora durante el almacenamiento reflejan la influencia de la concentración salina y la flora es esencialmente igual a la del bacon envasado al vacío a temperaturas mayores.

Con respecto a la carne de las aves domésticas comercializadas para consumo (pollos y gallinas, pavos y patos), al llegar éstas a la planta faenadora, albergan un gran número de microorganismos, de muchos tipos diferentes, en sus plumas, patas e intestinos. El escaldado para facilitar el desprendimiento de las plumas se realiza por inmersión de las aves, durante 30 segundos en un tanque de agua caliente (55 ºC aproximadamente). Debido al efecto de lavado y a la destrucción de las bacterias más termosensibles, entre las que figuran las alterantes psicrótrofas, disminuye el número de microorganismos de la canal. Las bacterias psicrótrofas se destruyen incluso cuando se emplean temperaturas de escaldado más bajas (unos 50 ºC para las aves cuyas canales se enfriarán por aire). Las desplumadoras mecánicas aumentan la carga microbiana de la piel de las aves y pueden ocasionar contaminaciones cruzadas y problemas por «aerosoles».

La evisceración también aumenta la carga microbiana al extender por la superficie los tipos fecales que pueden transferirse fácilmente a otras canales originando también problemas de contaminación cruzada. La carga microbiana alcanza el máximo inmediatamente antes de proceder al lavado, por lluvia o aspersión, de las canales. Esta operación que disminuye aproximadamente un 90 % de la carga microbiana de la canal va seguida de la refrigeración que puede realizarse por tres métodos. En los mataderos pequeños generalmente se lleva a cabo en tanques estáticos que contienen iguales cantidades de canales de aves y de agua con hielo. Las canales pueden permanecer en estos tanques varias horas y las situadas en las proximidades del fondo se contaminan mucho con las bacterias arrastradas por el agua de las canales situadas superiormente; por lo tanto, en estas condiciones se favorece el desarrollo de las bacterias psicrotrofas. En mataderos mayores se utilizan corrientemente enfriadoras mecánicas giratorias. Este sistema utiliza una, dos o tres unidades en serie, cada una de las cuales está formada por un tanque grande por el que fluye continuamente agua clorada en una dirección mientras las canales avanzan en dirección opuesta merced a un tornillo sin fin; el enfriamiento se mejora añadiendo hielo a una o más unidades. Además de enfriar conveniente las canales, si este sistema se utiliza convenientemente disminuye la carga microbiana de las últimas en un 90 % aproximadamente.

Su eficacia depende del flujo controlado de agua clorada. El último sistema es el enfriamiento por aire. Este método empleado cuando las canales van a venderse como tales, deseca la piel y por lo tanto retrasa el crecimiento de las bacterias alterantes psicrótrofas. Después del enfriamiento preliminar los recuentos microbianos de la piel de las aves varían de $5 - 10^3$ a $1 - 10^5$ por cm^2, mientras que los recuentos de la cavidad abdominal son generalmente $<1 - 10^4/cm^2$; los recuentos más bajos corresponden a las líneas de carnización que funcionan higiénica y eficientemente. En esta fase la microflora es muy compleja cualitativamente y entre los grupos bacterianos más corrientemente aislados figuran *micrococos, flavobacterias* y varios tipos intestinales, como *Escherichia, Enterobacter y Streptococcus sp*., y también *Acinetobacter sp.* Cuando las canales se mantienen a temperaturas de refrigeración la mayor parte del crecimiento microbiano tiene lugar en la piel y con menor intensidad en la superficie interna de la cavidad visceral. Durante unos 10 días, aproximadamente, el número de bacterias aumenta en la piel hasta alcanzar un máximo de $10^9 - 10^{10}/cm^2$. Este aumento se acompaña de la aparición de olores anormales (con recuentos de 10^7 bacterias/cm^2, aproximadamente), de una abundante producción de limo (con recuentos de unas 10^8 bacterias/cm^2) y de un aumento del pH hasta aproximadamente 7,5 y, por lo tanto, como era de esperar, la alteración de la carne de aves se parece mucho a la de otras especies. Además, como en la carne de mamíferos, la flora alterante de la carne de aves refrigerada está dominada por *Pseudomonas sp.* (tanto fluorescentes, como carentes de esta propiedad). De hecho, en las fases avanzadas de alteración de las aves en refrigeración, su piel presenta con frecuencia fluorescencia al iluminarla con luz ultravioleta, lo que se debe a la presencia de gran número de *pseudomonas* fluorescentes. En el momento de la alteración las *pseudomonas* representan del 70 al 80 % de la flora, pero también hay en menor número *Acinetobacter sp*. (un 10 % aproximadamente) y *Alteromonas (Pseudomonas) putrefaciens*. Este último microorganismo es muy interesante dado que su crecimiento es mucho más rápido en la pierna de las aves (pH = 6,5) que en la pechuga (pH = 5,8). Con el empleo de la cromatografía en fase gaseosa y de la espectrometría de masas se han intentado identificar los olores extraños producidos durante la alteración de las canales de pollo en refrigeración.

En estas condiciones se producen unas 22 sustancias volátiles y 15 de ellas se deben al ataque microbiano del tejido muscular, siendo las responsables, o estando asociadas, a los característicos olores extraños de las últimas fases de la alteración. Entre estos 15 productos figuraban: ácido sulfhídrico, metil mercaptan, dimetil sulfuro, acetato de metilo, acetato de etilo, metanol, etanol y benzaldehído; la gran variedad de productos identificados ilustra claramente la complejidad de este problema en lo que se refiere al papel de los microorganismos en la alteración.

Entrando ahora en el apartado de pescados y mariscos, podemos afirmar que la mayoría de los estudios microbiológicos del pescado se refieren a las variedades marinas que serán las únicas que normalmente hemos de consumir, ya sean de mar o de río. Se acepta generalmente que la musculatura de los peces sanos, recién capturados, es estéril, aunque se han encontrado bacterias en número variable en tres regiones del pescado: la capa mucosa, las branquias y los intestinos. Las cifras señaladas para la piel varían de 10^2 a 10^7 por cm, para las branquias o agallas de 10^3 a 10^6 por gramo y para el intestino de 10^3 a 10^8 por ml de contenido entérico.

Sin embargo, se ha señalado que las cifras más pequeñas de las indicadas corresponden a las bacterias del pescado procedente de aguas sin contaminar, mientras que las más altas son consecuencia de unas pobres condiciones higiénicas a bordo durante las primeras fases de manipulación. Las variaciones de los ambientes marinos afectan a los tipos de bacterias de la piel y agallas de los peces recién capturados. Así en los mares más fríos del hemisferio norte la flora bacteriana está dominada por los bacilos psicrótrofos Gram negativos: *Pseudomonas sp*. (60 %), *Acinetobacter/Moraxella* (14 %). La evisceración del pescado a bordo extiende la flora intestinal por su superficie. Los principales microorganismos encontrados en los intestinos pertenecen a *Vibrio sp*., si bien hay otros muchos géneros. El pescado se lava después con agua de mar y se almacena en hielo triturado o congelado, si ello es posible. El método tradicional es el almacenamiento con hielo por lo que lo estudiaremos con cierto detalle.

El hielo en el que se pretende conservar el pescado corrientemente está, a su vez, contaminado (unos 10^3 microorganismos por ml de agua de fusión) y además las bodegas de los barcos de pesca contienen generalmente una flora propia compuesta de *Pseudomonas y Acinetobacter sp*. Por lo tanto, cuando se coloca en hielo el pescado, que ya contiene una proporción bastante grande de *pseudomonas*, es muy probable que se contamine más con estos microorganismos. La alteración en el hielo es relativamente rápida, en parte por la proporción, relativamente grande, de *pseudomonas* que el pescado contiene inicialmente en la piel y en parte por el pH, relativamente alto, de muchas especies de pescado. Incluso bajo las mejores condiciones a una temperatura de 10 ºC, los recuentos totales pueden superar los 10^8 por g, después de 12 a 14 días de almacenamiento. A veces en las bodegas de los barcos la temperatura llega a 6 – 7º C y en estas condiciones las cargas máximas se alcanzan en 5-6 días.

La alteración del pescado es, por lo tanto, mucho más rápida que la de la carne cruda cuyos recuentos máximos se alcanzan únicamente después de 9-10 días de almacenamiento a 7 ºC. La calidad real del pescado desembarcado depende del tiempo que se mantuvo en hielo y de las condiciones higiénicas a bordo. Los recuentos bacterianos medios del pescado descargado en puerto, de las bodegas de buques factoría, son aproximadamente 10^6 por cm^2 de superficie de piel y cualitativamente la proporción de *Pseudomonas sp.,* es mayor que en el pescado recién capturado. Durante un prolongado almacenamiento en hielo las *pseudomonas* se convierten en el grupo dominante y representan el 80-90 % de la flora alterante cuando el recuento es máximo. Hasta en el pescado procedente de aguas cálidas las *pseudomonas* son el grupo predominante en el momento de la alteración y por lo tanto superan a la flora inicial formada principalmente por bacterias Gram positivas. Después de desembarcado el pescado puede permanecer varias horas en cajas sin hielo. En estas condiciones su temperatura sube y el crecimiento de las bacterias psicrótrofas es más rápido, de manera que cabe esperar un aumento 10 veces mayor en pocas horas.

Las cajas de madera, usadas mucho todavía en tierra, contienen un gran número de bacterias, superando con frecuencia los recuentos de 10^6 por cm^2; sin embargo, es probable que estas bacterias ejerzan muy poca influencia en la alteración del pescado, dado que el tiempo que permanece en las cajas se limita corrientemente a menos de 12 horas. Entonces el pescado se reenvasa en otras cajas, generalmente con hielo, transportándose al lugar de procesado, en donde, dependiendo del tipo de pescado, se filetea o procesa de otro modo. Todos estos hechos, incluido el fileteado y transporte, influyen en la flora bacteriana que se vuelve tanto más variada cuanto mayor es la manipulación. El pescado se altera como la carne, debido a sus enzimas autolíticas naturales y a la actividad bacteriana. La alteración se origina debido fundamentalmente a la actividad enzimática de bacilos Gram negativos, especialmente *pseudomonas*. Durante el almacenamiento prolongado del pescado, independientemente de que se haga con hielo o sin él, estos microorganismos son invariablemente los que predominan.

Las bacterias alterantes utilizan primero los compuestos de bajo peso molecular, como nucleótidos y aminoácidos de la musculatura del pescado, siendo su degradación la responsable de los olores repugnantes y de otros signos de alteración; por lo tanto, las proteínas, igual que en la carne, juegan un papel poco importante en la alteración.
Para la **salazón** del pescado se utilizan dos técnicas básicas, la «seca» y la «húmeda». En la primera, empleada principalmente para la salazón de arenques en barril, se extiende sal en la superficie del pescado que se deposita en capas separadas por otras de sal. En el salado húmedo el pescado se sumerge en una solución de sal; este método se sigue cuando el pescado ha de ahumarse. En ocasiones se emplea una combinación de los métodos seco y húmedo.

Independientemente del método seguido, la sal adicionada rebaja a la aw del pescado, como ya se ha estudiado en las carnes curadas, lo que tiene una gran influencia en los tipos corrientes de alteración. La flora normal del pescado, predominantemente Gram negativa, es relativamente sensible a las concentraciones altas de sal por lo que su número disminuye. La flora final depende de la fuerza de la salmuera. En muchas ocasiones los *micrococos* son la flora dominante, pero a concentraciones salinas mayores los problemas alterantes se deben a veces a un grupo especializado de bacterias.

Estas bacterias, representadas por los géneros *Halobacterium y Halococcus*, se denominan «halófilas obligadas» y toleran concentraciones de sal mayores del 20 % de NaCl; de hecho, para poder desarrollarse necesitan medios de cultivo con 10-15 % de NaCl. La alteración que originan es una coloración roja de la superficie del pescado (pescado «rosado») y se debe al crecimiento de estos microorganismos que producen un pigmento rojo.

Otro tipo de alteración, conocido como «oscurecimiento» se debe a un moho halofílico, *Sporendonema expizoum*; se asocia a la producción de manchas obscuras que se aprecian en la superficie carente de piel del pescado salado, sobre todo bacalao, y cuya intensidad varía del chocolate al marrón. El pescado ligeramente salazonado también es sensible a la producción de limo originado por la flora autóctona Gram negativa (sobre todo *pseudomonadáceas*); se caracteriza por la presencia en la superficie del pescado de una capa viscosa y pegajosa, de color beige. Para tratar a un pescado antes de ahumarse se lo eviscera y sufre un tratamiento con sal cuya concentración de NaCl depende del nivel deseado en el pescado. La salazón es relativamente suave y por lo tanto su acción conservadora es mínima, como sucede con el salmón y bacalao ahumados.

En ciertos pescados, como arenques «rojos» y salmón escandinavo, el salado es más intenso y juega un importante papel en la conservación del pescado. Después de someterse a la acción de la sal, el pescado se ahúma en «frío» o en «caliente». En el ahumado frío, empleado corrientemente, la temperatura del pescado no debe superar la de desnaturalización de sus proteínas (unos 30 ºC). El proceso que acarrea, tanto la desecación del pescado, como su impregnación con humo de madera, determina una disminución del número de bacterias, debido principalmente a las sustancias fenólicas del humo; sin embargo, globalmente los efectos de este procesado en la flora microbiana son poco importantes. En el ahumado en caliente, empleado con ciertos productos especiales enlatados, como brisling (espadines) y sild (arenques pequeños) la temperatura del pescado llega hasta, por ejemplo, 70 ºC durante 30 minutos, con lo que sólo sobreviven las bacterias termorresistentes. Los cambios microbiológicos que acaecen durante el almacenamiento del pescado ahumado no se han estudiado con detalle, pero los microorganismos predominantes en el momento de la alteración dependen mucho de las condiciones de procesado. En el sometido a un salmuerado ligero y a un ahumado frío suelen predominar las *pseudomonadales*, pero un ligero aumento en la concentración de sal determina que sean los *micrococos* los dominantes.

Una de las causas más corrientes de alteración del pescado ahumado es la contaminación con mohos; tanto *Penicillium,* como *Aspergillus sp*. que crecen fácilmente a temperaturas de refrigeración, se encuentran en el serrín empleado para la producción de humo y pueden desarrollarse después en el pescado almacenado. A concentraciones más altas de sal, la vida de almacén del pescado ahumado se prolonga varias semanas o meses, incluso a temperaturas ambientales altas, siendo de esperar pocos cambios en su flora microbiana. Con respecto a los mariscos, es sus diversas variedades, tenemos que las gambas recién capturadas son muy perecederas debido a la actividad bacteriana y enzimática.

La actividad bacteriana se favorece mucho por el gran contenido de aminoácidos y enzimas anfoliticas (proteasas) degradan rápidamente las proteínas proporcionando a las bacterias un sustrato de crecimiento ideal. Debido a su naturaleza perecedera las gambas se someten, tan pronto como es posible después de su captura, a congelación o ebullición, aunque tampoco es raro conservarlas con hielo. Su flora microbiana inicial es semejante a la del pescado recién capturado, pero su almacenamiento en hielo determina un aumento de la proporción de especies de *Acinetobacter/Moraxella* que llegan al 80 % de la flora total en el momento de la alteración. Sin embargo, *Alteromonas sp. y las pseudomonadales* juegan un papel secundario en la alteración de este alimento; la alteración se acompaña del aumento del amoníaco, trimetilamina, hipoxantina y ácido acético. Los cambios autolíticos son especialmente manifiestos en las langostas, lo que las convierte en otro alimento fácilmente perecedero. Estos enzimas (proteasas) se emplean en su «acondicionamiento» que requiere un almacenamiento en hielo de 2 – 4 días. Como en las gambas el prolongar el almacenamiento determina un aumento manifiesto de la proporción de *Acinetobacter y Moraxella* que son los que predominan en el momento de la alteración. La carne de los cangrejos también se altera rápidamente por lo que deben tratarse con agua hirviendo inmediatamente de capturados. En los cangrejos los estudios se han concentrado en la bacteriología de la carne cocida: parece lógico que la flora microbiana en el momento de la alteración esté dominada también por *Acinetobacter* y especies análogas.

Probablemente los moluscos bivalvos que más frecuentemente se consumen son las ostras, vieiras y mejillones. El problema microbiológico más importante asociado con estos alimentos es el riesgo de toxiinfección alimentaria debido a la contaminación, relativamente frecuente, del hábitat en donde se desarrollan. Por lo tanto, se necesita depurar estos alimentos en agua limpia clorada. De aquí que la flora natural de los bivalvos cambie mucho durante el tratamiento y que las características de la alteración varíen dependiendo de la eficacia del proceso de depuración.

Un detalle importante de los bivalvos es la cantidad significativa de carbohidratos que presentan en su carne (3 – 6 %) y que influye en el tipo de alteración. Si durante la depuración no se eliminan las bacterias fermentativas, como *Escherichia coli* y otros coliformes, la alteración consistirá inicialmente en amargor al formarse ácidos a partir de los carbohidratos. En los moluscos debidamente depurados, mantenidos a temperaturas de refrigeración, la alteración es totalmente distinta y va asociada a un aumento de las bases volátiles y de la hipoxantina, siendo Acinetobacter/Moraxella sp., la flora dominante.

Alteraciones en productos lácteos y derivados

Incluso cuando se obtiene en condiciones de asepsia, la leche contiene siempre microorganismos que proceden de los conductos galactóforos de la ubre de la vaca. Su número varía de cuarto a cuarto y de vaca a vaca, pero aproximadamente oscila entre 10^2 y 10^3 microorganismos por ml. En la práctica, la leche recién obtenida contiene unos 5 – 10^3 a 5 – 10^4 microorganismos por ml, constituidos por contaminantes procedentes del entorno de la ubre, del equipo de ordeño y de los manipuladores. Son muy variados los microorganismos que puede haber, entre ellos, *Pseudomonas, Acinetobacter/Moraxella, Flavobacterium, Micrococcus, Streptococcus, Lactobacillus y coliformes.* Además, debe señalarse que las ubres infectadas (mastitis) introducen en la leche bacterias potencialmente patógenas. Dado que la leche es un medio de crecimiento ideal para las bacterias, debe enfriarse tan rápidamente como sea posible. La introducción de tanques de refrigeración para toda la leche producida, junto con su recolección en cisternas refrigeradas ha influido mucho en la calidad bacteriológica de los aportes de leche cruda. La principal consecuencia de este cambio ha sido la disminución de la cantidad de leche alterada por acidificación.

La acidificación o cortado de la leche a las temperaturas corrientes se debe a las bacterias lácticas que crecen preferentemente a temperaturas mayores de 10 ºC. Estas bacterias originan ácido láctico, a partir del azúcar de la leche (lactosa), que da lugar a un sabor ácido y más tarde a la coagulación de la leche. La mayoría de las bacterias lácticas se destruyen por pasterización, pero unas pocas son termodúricas (por ej., *Streptococcus thermophilus*) y pueden causar problemas después de la pasterización. Al enfriar y refrigerar rápidamente la leche los problemas son algo distintos. En la actualidad son los psicrótrofos, sobre todo *pseudomonas*, los principales responsables de los problemas alterativos. Las bacterias psicrótrofas, que proceden originalmente del suelo y agua, se aíslan frecuentemente del equipo de ordeño de la granja, de las conducciones y de las cisternas de transporte. La refrigeración deficiente o el retraso en el enfriamiento de la leche aumenta mucho la proporción de psicrótrofos, pero su crecimiento continúa, aunque más lentamente, a las temperaturas de almacenamiento recomendadas para la leche cruda (3 – 7 ºC).

Los recuentos de bacterias psicrótrofas en los tanques de almacenamiento varían de 10^4 a 10^6 por dm^2, dependiendo de la intensidad y tipo de contaminación y de las condiciones de almacenamiento. Una gran proporción de estos psicrótrofos produce proteasas y lipasas. Muchas enzimas no son afectadas por la pasterización; de hecho, para inactivarlas se necesitan temperaturas de 150 ºC durante 10 segundos. Entre los defectos debido a las proteasas se incluye el amargor, siendo el enranciamiento el principal efecto deteriorante de las lipasas.

El proceso de esterilización implica el calentamiento de la leche a una temperatura lo suficientemente alta como para destruir todas las bacterias patógenas, como *Mycobacterium tuberculosis, Salmonella sp. y Brucella sp*. Al mismo tiempo se destruye la gran mayoría de otras bacterias, incluidas las alterantes por lo que aumenta la capacidad de conservación de la leche. La mayoría de la leche producida en el los principales países productores y exportadores, se pasteuriza por el método de temperatura alta / tiempo corto (HTST) en el que la leche se mantiene a 72 ºC por lo menos 15 segundos y a continuación se enfría rápidamente a menos de 10 ºC; el método antiguo de temperatura baja / tiempo largo (LTLT) (63 ºC durante 30 minutos) todavía se utiliza ocasionalmente, pero a escala muy pequeña.

Las bacterias que resisten la pasteurización, debido a su termorresistencia innata, reciben el nombre de «termodúricas». Están constituidas fundamentalmente por unas pocas especies de *Streptococcus* (por ej., *S. thermophilus*), *Micrococcus* (por ej., *M. luteus) y Corynebacterium (por ej., C. lacticum)*, junto con las esporas de ciertos *Bacillus sp.* sobre todo *B. cereus*. Estas bacterias se aíslan fácilmente del equipo lactológico y tuberías limpiadas deficientemente, si bien su número en los tanques de almacenamiento es generalmente pequeño. La alteración de la leche pasteurizada mantenida a temperatura ambiente se debe principalmente a las bacterias termodúricas, siendo corrientemente *B. cereus* el organismo predominante en el momento de la alteración. Esta bacteria produce el defecto conocido como «nata amarga» y es el responsable del cortado «dulce» de la leche pasteurizada (esto es, de la coagulación por renina sin formación de cuajada ácida).

Las bacterias psicrótrofas, tan importantes en la leche cruda, se destruyen fácilmente por pasteurización, pero sus enzimas no se afectan. Sin embargo, los psicrótrofos pueden constituir una causa importante de alteración de la leche pasteurizada, si después de aplicado este tratamiento tiene lugar la contaminación. Tal contaminación puede ser mínima, pero en condiciones de limpieza deficiente del utillaje es muy llamativa. Esta contaminación debe evitarse a toda costa, dado que la leche pasteurizada se almacena corrientemente a unos 7 ºC, temperatura a la que los psicrótrofos se desarrolla bien. La leche pasteurizada con una contaminación mínima, después de tratada, tiene una vida de almacén a 7 ºC de, al menos, 7 – 10 días. La leche tratada a temperatura ultra alta **(UHT)** es una leche homogeneizada, sometida a una temperatura, no menor de 132 ºC durante, al menos, 1 segundo, proceso que convierte a la leche en prácticamente estéril. La manera en que originalmente se esterilizaba la leche consistía en mantenerla a unos 100 ºC durante 30 minutos en botellas herméticamente cerradas; esta leche se caracterizaba por presentar un sabor «a cocida» y una textura muy cremosa que, junto con su aspecto más obscuro, la convertía en un producto poco atractivo.

La leche UHT carece de estas características y por lo tanto ha superado a la leche tradicional, esterilizada en las botellas. La leche UHT se envasa asépticamente en recipientes especiales de cartón (por ej., Tetrapak) que después se cierran con calor. Esta leche tiene el aspecto, el aroma y la calidad nutritiva de la pasterizada y permanece en condiciones aceptables varios meses, sin necesidad de refrigeración. La alteración de la leche UHT tiene lugar ocasionalmente debido al crecimiento de bacterias esporuladas, principalmente *Bacillus stearothermophilus y B. subtilis*, cuyas esporas o sobrevivieron al tratamiento o contaminaron a la leche procesada. Es más corriente la alteración a consecuencia de la actividad continuada de proteasas y lipasas termoestables producidas por las bacterias psicrótrofas en la leche cruda. La gelación de la leche UHT, que también puede originarse por un proceso químico, es igualmente producido por las proteasas. Entre los derivados lácteos, la manteca o mantequilla, comparativamente con otros, es un producto microbiológicamente estable ya que contiene poca humedad (15 %) y mucha grasa (80 %). El agua se presenta en forma de una fina emulsión en la fase grasa y las condiciones físicas de las gotitas de agua posiblemente ejercen un efecto inhibidor en el crecimiento microbiano. Además, muchas mantequillas se salan hasta concentraciones que varían del 3 al 13 % de NaCl, lo que ayuda a su conservación.

La fuente principal de microorganismos de la mantequilla es la crema con la que se elabora; en el caso de la mantequilla «dulce» se somete a pasterización. El batido de la crema para obtener mantequilla aumenta el número de microorganismos que se concentran en la mazada, pero al terminar el procesado su número es pequeño en la mantequilla y en las muy saladas se produce una disminución mayor durante el almacenamiento. Algunas mantequillas «dulces» se elaboran con un cultivo iniciador. Este cultivo, formado por bacterias conocidas, se inocula en la leche o crema para facilitar su acidificación en condiciones controladas, con lo que se alcanzan. En la mantequilla las características prefijadas y deseadas; en las mantequillas «dulces», la crema, una vez inoculada, se mantiene a temperaturas bajas para evitar que aumente la acidez antes del batido. Las mantequillas «ácidas» corrientemente se fabrican con crema pasterizada, inoculada con microorganismos iniciadores (*Streptococcus lactis y S. cremoris* generalmente); la crema se inocula a temperatura ambiente hasta que se alcanza un pH bajo (4,5-5). A continuación, se bate, pero no se sala, ya que la sal y el ácido reaccionan dando aromas desagradables. Para producir ácido se necesitan recuentos bacterianos altos (10^7 a 10^8 por gramo). Como alternativa se permite la acidificación natural de la crema que se pasteriza después, antes del batido. Por lo tanto, el contenido microbiano de las mantequillas recientes varía mucho, dependiendo del proceso de elaboración seguido; las «dulces» contienen muchos menos microorganismos que las «ácidas».

La alteración de la mantequilla puede tener origen microbiano, enzimático o químico; muchos de los aromas perjudiciales proceden de la crema, pero este tipo de deterioro no se estudiará aquí. La alteración microbiana se debe principalmente a las bacterias psicrótrofas ya que la mantequilla se almacena corrientemente en refrigeración. Las *pseudomonadales* y otros bacilos Gram negativos afines, que llegan al producto después de pasterizado, son corrientemente responsables de la rancidez producida por la hidrólisis de la grasa de la mantequilla, con liberación de ácidos grasos.

La actividad proteolítica de *Alteromonas putrefaciens*, al desarrollarse en la superficie de la mantequilla da lugar a la aparición de olores pútridos y de pigmentaciones superficiales. Los mohos también pueden crecer superficialmente originando coloraciones, generalmente están implicados miembros de los géneros: *Alternaria, Cladosporium, Aspergillus, Penicillium, Mucor y Rhizopus*. Las lipasas de la crema pueden inducir rancidez y entre las reacciones químicas se incluye la oxidación de las grasas insaturadas. En otro apartado, tenemos que existen unas 400 variedades conocidas de quesos que se agrupan en unas 20 clases. La mayoría de ellas se elaboran con la misma leche variando los microorganismos, enzimas y sal adicionados y cambiando la temperatura durante la elaboración y maduración. Los quesos se clasifican por su textura y por su grado de dureza, admitiéndose dos grandes grupos: el primero, **quesos madurados**, varía desde los quesos muy duros, con poca humedad, quesos para rallar (por ej., parmesano), pasando por los duros (por ej., Cheddar), a los semiblandos, con mayor humedad (por ej., Stilton) y blandos (por ej., Camembert). El segundo grupo lo constituyen los **quesos blandos sin madurar**, con un gran contenido de humedad (por ej., cottage). La mayoría de los quesos se fabrican utilizando el mismo proceso básico. Actualmente se emplea generalmente leche pasterizada, pero la maduración acaece más lentamente y debido a que la flora natural ha sido en gran parte destruida, deben adicionarse a la leche cultivos bacterianos iniciadores.

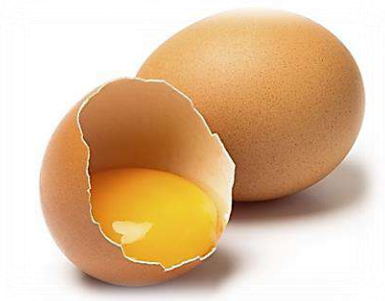
En el caso del queso Cheddar los cultivos iniciadores consisten en mezclas de diversas estirpes de *Streptococcus lactis* o en una mezcla de *S. lactis y S. cremoris*. Estas bacterias convierten la lactosa en ácido láctico, dando lugar a la primera fase de la elaboración de queso, esto es, a la acidificación o «maduración» de la leche. Cuando la leche ha alcanzado la acidez requerida, se le adiciona la renina que ayuda a la formación de la cuajada. Las últimas fases del proceso consisten en tratar la cuajada que, después de salada y prensada, se deja madurar; en el queso Cheddar la maduración dura unos 4 meses. El número máximo de microorganismos *lactobacilos* en los quesos madurados, representan el 99 % de la población. Durante la maduración, los *lactobacilos* descomponen lentamente la proteína, lo que ayuda a la aromatización del queso *(L. acidophilus).*

Al estudiar la alteración de los quesos debe hacerse hincapié en que los más duros, con menor contenido de humedad, tienen una vida de almacén más larga que los que son blandos. La alteración microbiológica del queso Cheddar madurado se debe principalmente al crecimiento de mohos en la superficie que originan pigmentaciones, si bien penetran poco en el queso.

Son muchos los mohos y levaduras implicados en este tipo de alteración, como *Penicillium* (da coloración verde), *Cladosporium* (verde a negra) y *Candida* (negra). Sin embargo, los quesos más duros poseen una capa de recubrimiento de cera o presentan corteza, lo que minimiza el problema. En los últimos años se han hecho populares los quesos envasados al vacío en películas, tipo de envasado que evita el desarrollo fúngico al excluirse el aire. La alteración bacteriana de los quesos es más corriente durante su elaboración y maduración. Si el pH es demasiado alto, las pseudomonas, que son contaminantes siempre presentes, aunque en pequeño número, crecen rápidamente y originan viscosidad. El queso «gaseado» es un problema bastante corriente, debido a coliformes como *Enterobacter sp*., que fermentan la lactosa con producción de dióxido de carbono; algunos *clostridios* también dan lugar a este defecto. Se puede controlar añadiendo al queso nisina, un antibiótico producido por ciertas cepas de *Streptococcus lactis*. Este antibiótico es especialmente activo frente a clostridios de los quesos que poseen un pH alto. En los quesos pueden presentarse diversos defectos del sabor, siendo los más importantes el amargor y la rancidez; muchos de estos defectos se deben a microorganismos. Durante la elaboración no suelen surgir problemas si se utilizan buenos cultivos iniciadores y se mantiene un alto nivel higiénico.

El yogur es un producto lácteo fermentado elaborado por adición de un cultivo iniciador mixto *(Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus)* a la leche que se ha tratado térmicamente para destruir su flora autóctona. Como en el queso, durante la incubación a unos 45 ºC, se produce ácido láctico, lo que hace bajar el pH a 4,0; a sus características aromáticas contribuyen cantidades vestigiales de otros productos, como el diacetilo y el acetaldehído. Después de la incubación el yogur se enfría rápidamente a 4 ºC para evitar que continúe produciéndose ácido; su almacenamiento a baja temperatura y la acidez del producto aseguran su conservación frente a la alteración por bacterias proteolíticas y otras que no toleran la acidez. Los microorganismos iniciadores continúan creciendo a la temperatura de almacenamiento muy lentamente, lo que limita su vida útil de almacén a unas 4 semanas, pasadas las cuales el exceso de ácido producido altera su aroma.

Alteraciones en huevos y ovoproductos



Se admite generalmente que el huevo de gallina es estéril en el momento de la puesta, salvo que se haya infectado congénitamente, normalmente por *salmonelas*. La contaminación del huevo acaece después de la puesta y el acceso más corriente de los microorganismos al interior de aquél tiene lugar a través de grietas de la cáscara. La **cáscara**, que está cubierta por una membrana que repele el agua, actúa como una barrera mecánica, si está intacta.

Otra forma distinta de penetración de los microorganismos, es a través de los poros que atraviesan la cáscara. Los poros están obturados, pero en los más grandes los «tapones» obturantes pueden faltar o cerrar deficientemente. La penetración se facilita por la humedad incorporada a los poros por efectos capilares. Debajo de la cáscara hay dos membranas que dificultan más la invasión bacteriana durante un tiempo limitado, pero que probablemente no constituyen barrera a las hifas infiltrativas de los mohos. La **clara** de los huevos contiene una serie de agentes antimicrobianos que limitan o inhiben por completo el crecimiento de aquellos microorganismos invasores con tal que los niveles de contaminación sean bajos. La lisozima es muy eficaz frente a bacterias Gram positivas cuyas paredes celulares lisa, mientras que la conalbúmina, que es activa lo mismo frente a bacterias Gram positivas que Gram negativas, actúa como agente quelante, ligando el hierro que es esencial para el crecimiento. Sin embargo, la **yema** es una buena fuente de nutrientes y no contiene agentes inhibidores; por lo tanto, cuando está implicada la yema, los microorganismos invasores crecen rápidamente. Esto puede ocurrir a los 10 días de puesto el huevo, cuando la yema contacta con la porción de aquél que ocupa la posición más alta. Si la penetración del huevo ha tenido lugar en la zona de la membrana testácea que contacta con la yema, los mecanismos de defensa del huevo sufren un «corto-circuito» por lo que cabe esperar que las bacterias invasoras se desarrollen rápidamente, fundamentalmente las bacterias Gram negativas.

Aunque el contenido interno de los huevos frescos es generalmente estéril, los ovoproductos elaborados comercialmente (líquidos, congelados o desecados) suelen estar muy contaminados con bacterias. Especialmente en el caso de los huevos líquidos enteros se ha visto que frecuentemente están contaminados con *salmonelas* que resisten las temperaturas, relativamente bajas, utilizadas corrientemente por la industria panadera. En Argentina (SENASA) se promulgaron normas sobre tratamiento térmico y desde entonces todos los huevos líquidos enteros que vayan a distribuirse refrigerados, para su conservación por congelación o por desecación-atomización, deben pasteurizarse a 64, 4º C durante 2 minutos y medio y a continuación enfriarse inmediatamente. Las *salmonelas* más termorresistentes se destruyen con este tratamiento sin que se alteren las características de los huevos que se buscan en la industria panadera. De otra parte, los huevos líquidos enteros, sometidos a pasterización y mantenidos en refrigeración permanecen en buenas condiciones, 6 días al menos, sin aumentos significativos de sus recuentos bacterianos, si bien debe evitarse la contaminación post-pasterización que se debe principalmente a *coliformes.* Las claras se pasterizan de forma convencional, aunque todavía no sean obligatorias las normas que controlan su tratamiento térmico. La clara refrigerada, sin tratar por el calor, es alterada generalmente por *pseudomonas* y otros bacilos Gram negativos parecidos, mientras que en la pasterizada predominan, como agentes alterantes, los *estreptococos fecales y los lactobacilos*.

Para destruir las *salmonelas* de las yemas líquidas se necesitan tratamientos térmicos más intensos, pero tampoco están en vigor las reglamentaciones o normas correspondientes.

Alteraciones en vegetales

Las verduras y frutas tan pronto como se recolectan experimentan cambios fisiológicos, algunos de los cuales determinan pérdidas de calidad. La actividad respiratoria implicada en la degradación de carbohidratos por las enzimas vegetales continúa y los cambios inducidos, sean ventajosos o perjudiciales, se ven muy influenciados por la madurez del vegetal en el momento de la recolección; por lo tanto, los productos vegetales corrientemente pueden almacenarse bastante tiempo con pequeños cambios de calidad, si se recolectaron en el momento oportuno. Muchas frutas carnosas, como el plátano, se cosechan antes de su maduración que continúa después, pero las frutas cítricas sólo maduran satisfactoriamente en el árbol. El bajo pH (<4,5) de la mayoría de las frutas significa que su alteración se deberá fundamentalmente a los hongos. De otra parte, el intervalo de pH de la mayoría de las hortalizas varía entre 5 y 7 por lo que su alteración podrán realizarla tanto mohos como bacterias, si bien los primeros constituyen el grupo principal. De acuerdo con sus características alterativas los hongos se clasifican, de forma un tanto arbitraria, en dos grupos: los patógenos vegetales que atacan al vegetal antes de su recolección y los saprófitos que lo hacen después de la recolección.

Una característica importante de la mayoría de los microorganismos alterantes, tanto fúngicos como bacterianos, es su capacidad de secreción de enzimas pectolíticas que ablandan y desintegran los tejidos vegetales. Por lo tanto, el crecimiento de mohos en frutas y verduras generalmente causa una grave desintegración tisular originando zonas blandas mohosas; este tipo de alteración se conoce como «podredumbre». Los nombres que reciben las distintas podredumbres se basan en el aspecto del alimento alterado. Un agente importante de alteración es *Penicillium*, muchas de cuyas especies atacan a las frutas; posiblemente hasta el 30 % de todas las frutas alteradas se deben a este género. También son sensibles muchas verduras carnosas, como tomates y pepinos, así como patatas y remolachas. Otra importante alteración es la podredumbre blanda por *Rhizopus* que afecta a muchas frutas y hortalizas, especialmente durante el transporte en condiciones deficientes de refrigeración.

Las frutillas y las papas, una vez recolectadas, son atacadas a menudo y su alteración se presenta en forma de áreas blandas y mohosas con un micelio grisáceo que se aprecia fácilmente. Aunque las bacterias tienen una importancia limitada en la alteración de las frutas, en torno al 35 % de las pérdidas por alteración microbiana de los productos vegetales tienen este origen. Las bacterias responsables son principalmente miembros de los géneros *Erwinia y Pseudomonas*.

Las formas más corrientes de alteración son las podredumbres blandas bacterianas que afectan a la mayoría de las hortalizas. La podredumbre blanda bacteriana también da lugar a infecciones antes de la recolección. Ciertas *erwinias y pseudomonas*, son importantes agentes patógenos de los vegetales, en los que producen enfermedades como royas, marchitamientos, úlceras y manchas en las hojas. Las bacterias causantes de podredumbre blanda, de las que *Erwinia carotovora* es la más importante, se encuentran en las plantas en el momento de su recolección y generalmente penetran en ellas a través de lesiones tisulares. El crecimiento de estos microorganismos es tan rápido que los mohos no pueden competir por lo que generalmente no se aíslan de los vegetales que padecen podredumbre blanda bacteriana. Las bacterias causantes de ablandamiento forman muy pronto enzimas pectolíticas que en pocos días originan una gran degradación tisular. En el caso de las patatas todo el tubérculo puede convertirse en una masa blanda; en los tomates la piel puede permanecer intacta, mientras todo el resto se convierte en un líquido turbio y las verduras foliares se transforman en masas semilíquidas. Muchos microorganismos llegan a contaminar los productos vegetales durante su recolección y manipulación posterior. Por lo tanto, conviene emplear un utillaje tan limpio como sea posible y minimizar las lesiones mecánicas de los productos vegetales; muchos de los microorganismos del exterior de frutas y verduras pueden eliminarse lavándolas con agua, si bien esta operación puede acortar su vida de almacén si no se escurren convenientemente. Es imprescindible un buen almacenamiento para reducir al mínimo el deterioro fisiológico y microbiológico. Corrientemente el almacenamiento se lleva a cabo en condiciones de frío (0 – 5 ºC), pero ciertos productos, como patatas y pepinos, se conservan mejor a 7 – 10 ºC. La humedad relativa óptima oscila entre 85 – 95 % y la vida de almacén puede mejorarse, por ejemplo, en manzanas y peras, por almacenamiento en atmósfera controlada (disminuyendo la concentración de oxígeno y aumentando la de dióxido de carbono). Las envolturas de plástico cerradas favorecen la presencia de alta humedad en su interior, lo que da por resultado un mayor deterioro microbiano. Las envolturas de plástico, con perforaciones, evitan en gran parte este problema, pero la humedad puede ser mayor que en los productos sin envolver. Pueden emplearse diversos productos químicos como tratamiento pre o postrecolección. En el último caso, como medidas corrientes de control se emplean baños o aspersiones con fungicidas/bactericidas a base de bórax (tetraborato sódico), ácido sórbico, fenilfenatos, difenilo y yodóforos, así como fumigaciones con polvos que contienen azufre o SO2.

Alteraciones en cereales y legumbres

La flora microbiana de los granos de cereales recién recolectados, como maíz, trigo y avena, pueden llegar a muchos millones de bacterias y mohos por gramo. Sin embargo, la baja Aw de los cereales inhibe eficazmente el crecimiento de todos los microorganismos siempre que las condiciones de almacenamiento sean las adecuadas, sin embargo, en condiciones de humedad es de esperar el crecimiento fúngico. Algunas fases implicadas en la fabricación de harina reducen la carga microbiana, siendo el blanqueado el más eficaz a este respecto. En las harinas convenientemente almacenadas los recuentos fúngicos permanecen constantes, unos pocos millares por gramo, siendo las especies más corrientemente aisladas las de los géneros *Penicillium, Aspergillus y Rhizopus.* Las bacterias disminuyen en número durante el almacenamiento, siendo corrientes los recuentos menores de 1.000 por gramo; *Bacillus sp*. es el grupo dominante. Cuando la humedad supera los límites normales es posible el desarrollo fúngico y silos niveles de Aw son todavía mayores ocurrirá el crecimiento de *Bacillus sp.* El pan producido comercialmente tiene una humedad lo suficientemente baja como para inhibir el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, exceptuados los mohos que son los principales agentes alterantes; de hecho, los mohos son los responsables del 1 % de las pérdidas anuales de la producción de pan, en promedio global. Entre los más corrientes figuran *Rhizopus nigricans*, el «moho del pan» que origina puntos negros característicos constituidos por esporangios, *Penicillium y Aspergillus sp.* que producen abundantes conidios verdes y *Neurospora sitophila*, el «moho rojo» del pan. La alteración fúngica la favorecen el cortado en rebanadas del pan, su envasado estando demasiado caliente y el almacenamiento en un ambiente cálido y húmedo. La filamentosidad del pan, producida por *Bacillus sp*., raramente se ve ahora en el pan producido industrialmente. Se caracteriza inicialmente por manchas marrones que se acompañan de un olor desagradable y más tarde se produce desintegración de la miga y de las rebanadas; la alteración se debe a la hidrólisis de la proteína de la harina y del almidón que dan lugar a un pan pegajoso y filamentoso. Como mejor se controla es mediante el almacenamiento a baja temperatura, con adición de conservadores (por ej., propionato de calcio o ácido sórbico) y empleando una harina de buena calidad. Los mohos son los responsables de la mayoría de los problemas alterativos de los productos de bollería, si bien la situación se complica por la gran variedad de ingredientes que puede incorporárseles, algunos de los cuales, como nata y crema de imitación, natillas y chocolates han estado implicados en brotes de toxiinfecciones alimentarias.

Alteraciones en alimentos enlatados

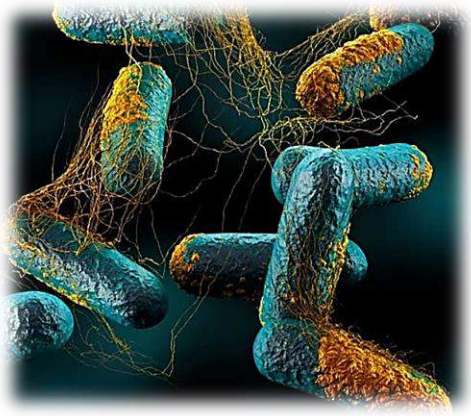
Tradicionalmente el enlatado es un método de conservación de alimentos en el que se incluyen en recipientes cerrados herméticamente. Se les aplica calor de forma que se destruyan o inactiven los microorganismos, sus toxinas y enzimas, con lo que el alimento, no se altera, ni origina efectos nocivos. Desde el punto de vista biológico este método puede fallar por una o dos razones. Primera, por una contaminación después del procesado, debida a la penetración de microorganismos por fugas de los sertidos (**CIERRE o SERTIDO**: Unión de la tapa (o el fondo) con el cuerpo por medio de una operación de engatillado y aplastado), y segunda porque sobreviva algún microorganismo por esporulación o no, debido a un tratamiento térmico deficiente. Más recientemente se ha establecido un nuevo proceso de enlatado, especialmente para alimentos líquidos, en el que se utiliza un tratamiento a temperatura alta, tiempo corto (HTST) acompañado del llenado aséptico de envases pasterizados, pero, como en el método más tradicional, los problemas son aquí fundamentalmente los mismos. Antes de revisar con más detalle la alteración microbiológica de los alimentos enlatados debe señalarse que también puede deberse a cambios químicos, de los que el más importante es el «abombamiento por hidrógeno». Se debe a la reacción del metal de la lata (hierro de hojalata) con los ácidos de los alimentos, produciéndose así hidrógeno, que es el responsable del hinchamiento del bote. Cuanto mayor es la acidez del alimento, tanto mayor es la probabilidad de que surja este problema, si bien unos buenos barnices internos o barnices sanitarios, evitarán en gran parte esta alteración. Son muchos los microorganismos responsables de las alteraciones por fugas, que tienen lugar después del procesado y cuya fuente principal es el agua empleada para la refrigeración de las latas tratadas por el calor. La calidad microbiológica de esta agua influye muchísimo en la frecuencia con que se da la recontaminación, por lo que su recuento total debe ser menor de 100 microorganismos por ml.

Un detalle interesante de este problema es que las bacterias móviles penetran por las fugas más rápidamente que las inmóviles. Una buena cloración es lo mejor para rebajar la carga microbiana del agua de refrigeración a niveles aceptables. Otros muchos factores contribuyen a la recontaminación posprocesado, siendo uno de los más importantes el de las latas defectuosas. El punto de entrada más fácil para los microorganismos es el de la unión del sertido lateral con la doble agrafadura del ribete de fondos y tapas del bote; por ello es muy importante controlar las operaciones de cerrado en estos lugares. Otro punto de fugas lo constituye el propio sertido lateral, por lo que es esencial asegurar el grosor óptimo del ribete y el solapado de la tapa y de las pestañas del cuerpo; también es de gran importancia la calidad y la cantidad del barniz aplicado al sertido. Una tercera puerta de entrada, aunque menos frecuente, es un pequeño poro o corte en la lámina metálica con la que se construyó la lata.

Desde 1985 se admiten las junturas laterales soldadas. En consecuencia, cada vez habrá una proporción mayor de latas cuyo sertido lateral presentará un solapado mínimo. Por lo tanto, las uniones (ribetes) del sertido lateral del bote con los fondos y tapas serán mucho menos voluminosas, con lo que las posibilidades de entrada de bacterias por estos puntos disminuirán mucho. Otro cambio en la fabricación de botes, que cada vez es más popular, es la elaboración, de forma continua y con la misma hoja metálica, del fondo y cuerpo de la lata; esto elimina la necesidad de sertidos laterales y de ribetes de fondos, con lo que las fugas en estos botes sólo son posibles en el ribete de unión entre cuerpo y tapa a no ser que la lámina de hojalata o de aluminio presente defectos. Cuando la alteración se debe a fugas por los sertidos, las bacterias implicadas tienen corrientemente temperaturas óptimas de crecimiento relativamente bajas (25-35ºC) y se destruyen fácilmente a las temperaturas de procesado.

Generalmente se aísla más de un tipo; entre ellas se encuentran miembros de los géneros *Pseudomonas, Alcaligenes y Flavobacterium,* además de *coliformes y micrococos*. Los tipos citados son contaminantes corrientes cuando los niveles de cloración del agua de refrigeración son mínimos o inexistentes; cuando la cloración está ligeramente por debajo de los estándares pueden estar implicadas especies de *Bacillus y Clostridium* debido a que sus esporas son muy resistentes a la cloración. Cuando se piensa que casi dos tercios de todos los tipos de alteración de los alimentos enlatados, se deben a su reinfección, después del tratamiento térmico, es lógico remarcar la importancia de las medidas de control, especialmente una buena cloración del agua de enfriamiento.

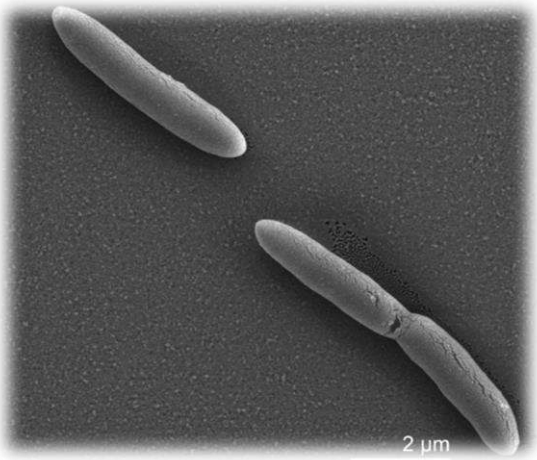
El fin del tratamiento térmico es la destrucción o inactivación de los microorganismos y de sus productos, esto es, asegurar que los alimentos enlatados son «comercialmente estériles». Tales alimentos pueden no ser estériles en el sentido absoluto del término, pero cualquier espora o microorganismo que haya sobrevivido al tratamiento será incapaz de desarrollarse.



El tratamiento térmico necesario para la esterilización comercial viene determinado, en gran parte, por el pH del alimento. A pH mayor de 4,5 las esporas de *Clostridium botulinum*, que son muy termorresistentes, pueden germinar por lo que cabe la posibilidad del crecimiento de las células vegetativas con la consiguiente producción de toxina. Los alimentos cuyos pH son mayores de 4,5 reciben, por lo tanto, tratamientos térmicos duros, a temperaturas de 110 – 121 ºC. Por el contrario, los alimentos de pH menor de 4,5 reciben tratamientos térmicos relativamente suaves, por lo que generalmente no se utilizan las temperaturas que superan los 100 ºC. La velocidad de destrucción de las esporas bacterianas (o de las células vegetativas que son mucho menos termorresistentes) es función de la temperatura y del tiempo: cuanto mayor es la temperatura, mayor es la velocidad de destrucción bacteriana en un tiempo dado. La destrucción bacteriana se dice que es logarítmica, lo que significa que, en cada unidad de tiempo sucesiva, se destruye el mismo porcentaje de bacterias sobrevivientes.

Desde el punto de vista práctico es importante, por lo tanto, asegurarse de que los alimentos que van a enlatarse posean un número predecible de esporas que pueden destruirse por el tratamiento térmico normalmente aplicado: por lo tanto, la calidad microbiológica de la materia prima y los estándares de higiene de la línea de trabajo deben controlarse cuidadosamente. En la categoría de alimentos con baja acidez, se incluyen carnes enlatadas, aves, pescados, hortalizas, sopas, judías, espaguetis y pudines de leche; su alteración se debe principalmente a *Bacillus y Clostridium sp*., debido a la termorresistencia de sus esporas. *Bacillus stearothermophilus* es la única especie de *Bacillus* de importancia industrial y es el responsable del deterioro por «amargor», es decir, produce ácidos a partir de los carbohidratos que «amargan» el alimento, pero no forma gas con lo que los fondos y tapas de los botes mantienen su forma normal. *B. stearothermophilus* es termófilo obligado: todas sus estirpes crecen a 65 ºC, pero ninguna lo hace por debajo de 35 ºC. Produce esporas muy termorresistentes que son unas diez veces más resistentes que las de *C. botulinum*. Por lo tanto, los alimentos que se han tratado por el calor para destruir las esporas de *C. botulinum*, pueden contener esporas viables de *B. stearothermophilus*. Sin embargo, debido a su alta temperatura mínima de crecimiento, los botes mantenidos a temperaturas menores de 35 ºC no se alterarán, aunque posean esporas de dicho bacilo. Esto constituye un buen ejemplo del concepto de envases comercialmente estériles. Los alimentos enlatados, sensibles a esta alteración, son guisantes y productos vegetales similares que se someten a un tratamiento térmico generalmente largo y de tipo medio. Aunque *Bacillus coagulans* también ha estado implicado en la alteración por «amargor», sus esporas no son muy termorresistentes y tiene escasa importancia actualmente.

Otro microorganismo termófilo importante que produce esporas, pero menos termorresistentes que las de *B. stearothermophilus*, es *C. thermosaccharolyticum*; produce alteración con abombamiento de los alimentos enlatados. Esta alteración se debe a la fermentación de los carbohidratos que forman ácidos y grandes cantidades de gas: dióxido de carbono e hidrógeno; si se alcanza presión suficiente, se distienden los fondos y tapas y ocasionalmente salta la agrafadura lateral saliendo al exterior los contenidos del bote. Las legumbres enlatadas con salsa de tomate suelen ser de los alimentos más corrientemente afectados. *Desulfotomaculum nigrificans* produce la «alteración sulfurosa». D. nigrificans es un anaerobio obligado, Gram negativo, que produce esporas con una termorresistencia intermedia entre las de B. stearothermophilus y las de C. thermosaccharolyticum. El ácido sulfhídrico, producido por la hidrólisis de las proteínas, es soluble en el producto y reacciona con el hierro del bote produciendo sulfuro de hierro responsable del ennegrecimiento del alimento. A medida que el sulfuro de hidrógeno alcanza niveles altos, el olor de esta alteración resulta muy desagradable. Afortunadamente este tipo de alteración es raro, debido a la muy escasa incidencia de esporas de este microorganismo y a su alta temperatura mínima de crecimiento.



Como mejor se controlan los microorganismos esporulados que sobreviven al tratamiento térmico es enfriando las latas tan rápidamente como sea posible, después de procesadas. Particularmente los termófilos del amargor o «fermentación simple» se multiplican rápidamente entre 50 – 70 ºC y por lo tanto el no enfriar inmediatamente las latas procesadas a temperaturas próximas a 35 ºC permite una rápida multiplicación y da lugar a un grave deterioro. La microbiología de los jamones enlatados difiere de la de otros alimentos de baja acidez por lo que se merece un estudio aparte. La conservación del jamón enlatado se basa en parte en un tratamiento térmico medio que destruye muchas de las bacterias más termo sensibles; para ello debe alcanzarse una temperatura interna en el jamón de unos 70 ºC. Debido a su relativa termoestabilidad, algunos *estreptococos* originan con frecuencia problemas alterativos, como licuefacción de la gelatina y amargor. También están implicados *clostridios y bacilos* y en los últimos años ha atraído mucho interés el peligro potencial de *Clostridium botulinum* en este alimento. Diversos factores interrelacionados entre sí, por ejemplo, sal, nitrito, pH y temperatura de almacenamiento juegan una parte importante en la conservación del jamón, al inhibir el desarrollo de las esporas germinadas. Se admite que el nitrito inhibe al *C. botulinum* por diversos mecanismos, pero su acción inhibidora se estimula más al aumentar la concentración de sal y/o descender el pH.

Se han hecho manifestaciones sobre la posible toxicidad de los nitritos para las personas. Los nitritos pueden reaccionar con algunas de las aminas presentes naturalmente en la carne, para formar nitrosaminas, de las que algunas son carcinogénicas bajo ciertas condiciones de empleo. Por lo tanto, ya que el nitrito juega un papel fundamental en la inhibición del desarrollo de las esporas germinadas, nos enfrentamos con un dilema y actualmente se está investigando mucho para aclarar algunos de sus problemas. Se han sugerido métodos alternativos de conservación, como el empleo de nisina, antibiótico producido por los *estreptococos lácticos* cuyo uso está permitido en los alimentos; la nisina combinada con niveles bajos de nitrito es especialmente eficaz. El dióxido de azufre y el ácido sórbico también pueden suplir parcial o totalmente al nitrito. Los alimentos cuyos valores de pH son <4,5 comprenden: tomates, peras, melocotones, ananás o piñas y sus jugos, además de los encurtidos y ciertas salsas. Los microorganismos que causan la alteración de estos productos son muy variados y aquí estudiaremos algunos de los más importantes y los efectos alterativos que producen. *B. coagulans*, microorganismo termófilo productor de la «fermentación simple o amargor», crece en un rango de pH de 4 – 4,5 y a veces está implicado en la alteración de los tomates y de su jugo, generalmente debido a fugas en el sertido lateral.

Las esporas de *B. coagulans* son termosensibles y suelen destruirse por los tratamientos térmicos medios empleados, si bien se han recomendado temperaturas de procesado mayores de 100 ºC como medida adicional de seguridad. Algunos *clostridios*, sobre todo *C. pasteurianum y C butyricum*, también crecen bien en el rango de pH citado y dan lugar a la alteración, con producción de gas, de los tomates, peras y otras frutas enlatadas. Las esporas producidas por estos *clostridios* son incluso más termolábiles y puesto que se destruyen a 100 ºC en 15 minutos es difícil que el procesado sea inadecuado. Entre las bacterias no esporuladas, las más frecuentemente incriminadas en la alteración de estos alimentos ácidos son las lácticas. *Lactobacillus brevis* origina corrientemente fermentación en el cátchup, salsa Worcester, encurtidos y salsas y aderezos de ensaladas.

Otros *lactobacilos y leuconostoc,* ocasionan esporádicamente la alteración de varias frutas y jugos de frutas enlatadas. Estas bacterias *lácticas* (por ej., algunos *Lactobacillus sp*; y todos los *Leuconostoc sp*. producen gas y también ácido a partir del jarabe, por lo que la alteración se acompaña de abombamiento. Otros productos finales son ácido acético y alcohol etílico, por lo que a estas bacterias *lácticas* se les denomina heterofermentativas. Con las bacterias *lácticas* homofermentativas (es decir, los demás *lactobacilos* y todos los Streptococcus sp.) sólo se produce ácido láctico por fermentación del azúcar. Las levaduras, por su parte, son muy termosensibles y por lo tanto raramente están implicadas en la alteración de los alimentos enlatados. Ciertas *Torulopsis sp* originan ocasionalmente la alteración gaseosa de la leche condensada, cuya conservación descansa más en su gran contenido azucarado que en el tratamiento térmico recibido. Otras levaduras como *Saccharomyces sp*., han dado lugar a la alteración de jugos, cítricos. Como las levaduras, los mohos en raras ocasiones originan alteraciones, aunque hay dos notables excepciones: *Byssochlamys fulva y B. nivea*, cuyas ascosporas son muy termorresistentes, tolerando 85 ºC durante 30 minutos. Los principales alimentos a los que atacan son fresas y frambuesas que pueden desintegrarse totalmente durante su alteración, debido a la acción de las enzimas pectolíticas producidas por los mohos. La mejor forma de controlar este tipo de alteración es con un pretratamiento de la fruta infectada con bromuro de metilo gaseoso o con ácido peracético y limpiando cuidadosamente tanto la materia prima como el equipo de procesado.

Alteraciones en alimentos congelados

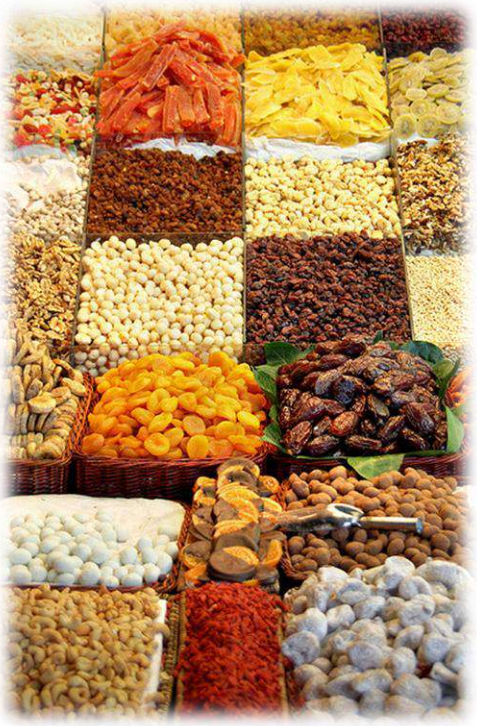
La congelación se inicia en los alimentos generalmente de -1 a -3 ºC y a medida que disminuye la temperatura es mayor la cantidad de alimento que se congela. En la carne y en el pescado el agua no se congela en su totalidad hasta los -50 a -70 ºC, si bien en el caso de frutas y hortalizas tales cifras corresponden a -16 y -20 ºC. Por lo tanto, a temperaturas ligeramente por debajo de los 0 ºC los microorganismos disponen para su crecimiento de agua sin congelar y ciertas bacterias especializadas pueden crecer a -7 ºC e incluso algunos mohos pueden hacerlo a -10 ºC. A medida que la temperatura desciende por debajo de 0 ºC se forman una serie de mezclas eutécticas (mezclas de hielo/solutos) que se acompañan de un aumento en la concentración de los sólidos disueltos en el agua sin congelar. Estos aumentos de la concentración de solutos disminuyen progresivamente la Aw lo que tiene graves consecuencias en la población microbiana; por lo tanto, los microorganismos que crecen a temperaturas subcero para poder desarrollarse deben tolerar también valores bajos de Aw. Aunque algunos microorganismos se destruyen durante la congelación, el 50 % aproximadamente la resisten, si bien esta cifra está influenciada por una serie de factores, como tipo de microorganismo, velocidad de congelación y composición del sustrato a congelar. Las esporas bacterianas no se afectan por la congelación y en general los bacilos y cocos Gram positivos son más resistentes que las bacterias Gram negativas.

Hace tiempo que se ha observado que la viabilidad de los microorganismos aumenta al hacerlo la velocidad de congelación, desde la «lenta» de los congeladores domésticos convencionales a los procesos «rápidos» utilizados por la industria. Este aumento de la sobrevivencia se debe principal y probablemente a la disminución del tiempo de contacto de los microorganismos sensibles con las soluciones peligrosas, muy concentradas, en el agua sin congelar. Cuando la congelación es más rápida, la viabilidad disminuye debido posiblemente a la formación interiormente de cristales de hielo que destruyen las membranas celulares. A velocidades de congelación «muy rápidas», como por ejemplo las alcanzadas con nitrógeno líquido, la formación de cristales disminuye, sustituyéndose por la «vitrificación». Hay una serie de sustancias, como glucosa, extracto seco de la leche, grasas y glutamato sódico, que son «protectoras».

Aunque las principales pérdidas de viabilidad microbiana acaecen durante la congelación inicial, la muerte microbiana también tiene lugar posteriormente, durante el almacenamiento en congelación. Con tal que la temperatura de almacenamiento sea suficientemente baja, las tasas de muerte son mínimas, pero es evidente una cierta pérdida de viabilidad a las temperaturas corrientes de almacenamiento de los alimentos en congelación (-20 ºC), sobre todo en los primeros días. La disminución de los recuentos de microorganismos viables, mantenidos entre -5 y -10 ºC, es mucho mayor que a -20 ºC, pero mientras las temperaturas de almacenamiento mayores constituyen un método eficaz de disminuir los recuentos, contribuyen a aumentar la velocidad de deterioro alimenticio por otras causas. La calidad puede alterarse hasta cuando se inhibe por completo el crecimiento microbiano, a consecuencia de la continua actividad de las enzimas microbianas liberadas o de las enzimas autóctonas del alimento; en el caso de las hortalizas estas enzimas se destruyen por escaldado. Durante la congelación y el almacenamiento en frío pueden tener lugar otros cambios físico-químicos y bioquímicos peligrosos. Cuando las bacterias se congelan y después se descongelan pueden observarse tres tipos de células: no lesionadas, lesionadas y muertas. Las no lesionadas crecen en medios nutritivos mínimos y en los medios selectivos utilizados corrientemente para su aislamiento; por el contrario, las células muertas no crecen en ningún medio. Las células lesionadas son más delicadas nutritivamente mientras se recuperan de las lesiones producidas por la congelación; sólo crecen en medios que proporcionen ciertos factores energéticos que les son necesarios para reparar la lesión. Tal reparación es rápida, completándose en menos de 2 horas; también puede tener lugar en el alimento descongelado con tal que disponga de los nutrientes necesarios. Este hallazgo tiene importantes aplicaciones al emplear medios selectivos para el recuento bacteriano de los alimentos congelados; las recuperaciones bacterianas pueden disminuir mucho, dando un resultado falso, si ha sido imposible la reparación de la lesión. Como mejor se realiza la curación de la lesión es, o preincubando las muestras en un medio complejo, o dejando que el alimento se descongele unas 2 horas aproximadamente antes de proceder al recuento bacteriano en medios selectivos. La velocidad de la descongelación influye en el número de microorganismos que sobreviven al ciclo y con una descongelación rápida se obtienen recuentos algo mayores. Los microorganismos supervivientes comienzan a multiplicarse, como en el ciclo de crecimiento normal, después de un período de latencia, pero este período se prolonga debido a la baja temperatura propia del alimento, de forma que, para establecerse la fase de crecimiento logarítmico pueden requerirse de 3 a 6 horas.

Cuando los alimentos congelados se dejan descongelar durante mucho tiempo a, por ejemplo 3 – 10 ºC, los microorganismos psicrótrofos constituyen la flora dominante causante del deterioro subsiguiente. En otros casos los tipos de microorganismos que se desarrollan dependen de la temperatura a que se mantiene el alimento descongelado, pero los microorganismos predominantes en la mayoría de los alimentos son iguales a los del correspondiente producto sin congelar. En los paquetes o envases grandes, por ej., pavos congelados, en los que se establece un gradiente de temperatura entre la superficie caliente y el interior frío, se presentan problemas peculiares. Si se descongelan a temperaturas demasiado altas el crecimiento bacteriano en la superficie puede ser demasiado rápido. Sin embargo, si la descongelación es suficientemente rápida y el alimento se consume a las pocas horas no suelen presentarse problemas; durante este tiempo recongelar el alimento descongelado no es peligroso en absoluto, si bien no es de recomendar en lo que atañe a la conservación de la textura, del aroma y de las propiedades nutritivas. Hay algunos casos en los que la flora alterante del alimento congelado, una vez descongelado, es distinta de la del producto fresco original, constituyendo un buen ejemplo los guisantes descongelados: durante el procesado, los *leuconostoc y estreptococos* van aumentando en las líneas de producción, siendo estas bacterias las que predominan en la flora alterante; atacan a los azúcares (principalmente sacarosa) de los guisantes, con la caída consiguiente del pH y la aparición de una tonalidad amarilla. Otros cambios que originan son la producción de una copiosa cantidad de limo o viscosidad en la superficie de los guisantes junto con olores típicos a «vinagrería» o a «mantequería», según la cepa bacteriana actuante.

Alteraciones en alimentos deshidratados



La desecación es el método más antiguo de conservación de alimentos y puede llevarse a cabo de diversas formas. Ya nos hemos referido al salado y ahumado que actúan indirectamente bajando la Aw del alimento. La eliminación directa del agua puede tener lugar por tres métodos básicos: **desecación solar, deshidratación mecánica** y **liofilización.** La desecación solar, limitada a los climas cálidos y secos, se emplea con frutas como pasas, ciruelas e higos, que se extienden en bandejas y se les da vuelta durante la desecación. La deshidratación mecánica convencional, realizada en hornos o túneles, implica el paso de aire caliente por el alimento, especialmente hortalizas, que se cortan o trituran para aumentar la relación área/volumen con lo que se mejora la eficiencia de la deshidratación. Actualmente se emplea mucho el principio del «lecho fluido» en el que se inyecta aire caliente entre las partículas de alimento que se mantienen en un estado de agitación que aumenta más la eficacia de la deshidratación.

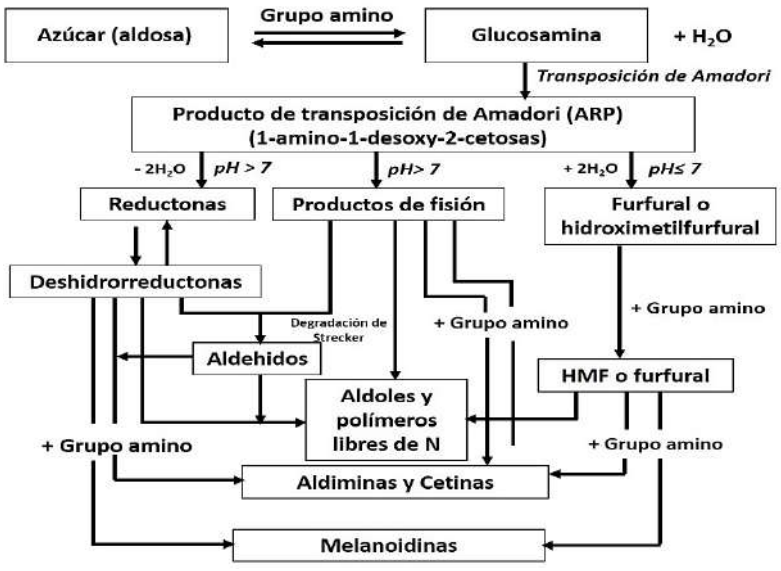
Los alimentos líquidos, como leche, ovoproductos y el café, pueden deshidratarse nebulizando o atomizando el producto en una corriente de aire caliente; esta técnica ha superado con mucho a la deshidratación en tambores que antes se empleaba mucho con los productos lácteos. La liofilización consiste básicamente en la deshidratación a gran vacío del material congelado, que se calienta lo suficiente para permitir que el hielo se convierta directamente en vapor de agua (sublimación). Esta técnica, utilizada corrientemente con carnes y pescados que se desnaturalizan si se deshidratan por los métodos corrientes, proporciona el producto de más alta calidad que puede obtenerse por cualquiera de los métodos de deshidratación.

La lesión celular se reduce al mínimo, lo mismo que las distintas reacciones degradativas que a menudo acaecen durante la deshidratación convencional, como desnaturalización proteica y reacciones de pardeamiento enzimático y no enzimático. En la deshidratación convencional empleada con las hortalizas, la flora microbiana se modifica durante las operaciones iniciales de procesado, como preparación de cubitos y de trozos similares; salvo que el equipo esté escrupulosamente limpio el recuento microbiano aumentará. Sin embargo, como en las hortalizas congeladas, hay que practicar el escaldado lo que reduce mucho los recuentos microbianos. Aunque durante la primera fase de la deshidratación se utilizan temperaturas de hasta 90 ºC, la rápida pérdida de humedad de los alimentos durante este período determina un efecto de enfriamiento y ayuda a mantener la temperatura entre 40 y 50 ºC, de aquí que sólo se origine una pequeña disminución de los recuentos microbianos. En la segunda fase de la deshidratación, las temperaturas son mayores (60 – 70) y durante la misma se destruyen las levaduras y muchas bacterias. La flora residual al terminar la deshidratación se compone principalmente de esporulados *(Bacillus y Clostridium sp*.), *enterococos* y diversos mohos (por ej., *Aspergillus, Penicillium, Alternaria y Cladosporium sp*.). En la leche y ovoproductos en polvo, desecados por atomización, las temperaturas alcanzadas no son tan altas y en consecuencia persiste una flora mucho más variada en la que puede haber hasta *Salmonella sp*.; entonces, para evitar este peligro, la leche se pasteriza antes de su desecación. Puesto que la liofilización se ideó inicialmente para conservar el material biológico, nada tiene de extraño que a menudo los recuentos microbianos de los alimentos liofilizados sean altos. Los alimentos deben congelarse antes de deshidratarse y los efectos de la congelación, estudiados más atrás, deben manifestarse originando cambios microbianos en los alimentos. Aunque la deshidratación, desde el estado congelado, tiene lugar a vacío, todavía puede aplicarse calor para sublimar el hielo. A medida que desaparece la interfase congelada, las temperaturas en la proximidad de la superficie aumentan hasta las de la placa de calentamiento (40 – 50 ºC) y consecuentemente en esta región tendrá lugar una cierta destrucción de las bacterias termo sensibles. Sin embargo, la temperatura del centro del alimento sólo en las últimas fases de la deshidratación supera los 0 ºC por lo que en esta zona no cabe esperar un efecto letal. Todo lo expuesto significa que después de la liofilización todavía queda sobre un 30 % de la flora original y a menudo los recuentos de los alimentos deshidratados de esta forma superan los 100.000 microorganismos por gramo. Durante el almacenamiento de los alimentos deshidratados ocurren muchos cambios, siendo la mayoría de origen no microbiano. El más corriente y más importante de los cambios es el pardeamiento no enzimático (Reacción de Maillard) que consta de una serie compleja de reacciones químicas entre los azúcares reductores y los aminoácidos o proteínas.

Los niveles de Aw que deben alcanzarse durante la deshidratación para frenar este pardeamiento son mucho más bajos que los necesarios para inhibir el crecimiento microbiano, por lo que así no habrá lugar a la alteración de este origen. De hecho, durante el almacenamiento disminuye el número de microorganismos viables, si bien las esporas bacterianas y fúngicas no se afectan. Si los alimentos deshidratados se envasan defectuosamente o se almacenan en condiciones de humedad, pueden reabsorber agua suficiente para permitir el crecimiento de mohos, pero no el bacteriano que requiere más humedad. Cuando los alimentos deshidratados se rehidratan, los microorganismos que contienen reaccionan del mismo modo que los de los alimentos congelados cuando se descongelan: presentan una fase de latencia del crecimiento y muchos microorganismos exhiben lesiones metabólicas. Sin duda alguna la temperatura del agua de rehidratación ejerce un marcado efecto en la flora y en la posterior velocidad de alteración del alimento. Si se emplea agua hirviendo, predominará *Bacillus sp*. y producirá la alteración, pero a temperaturas de rehidratación progresivamente menores, la flora será cada vez más variada y contendrá microorganismos más termosensibles. Cuando se usa el almacenamiento en refrigeración la vida de almacén de la mayoría de los alimentos rehidratados se limita a 1 – 2 días, pero si se hace uso del almacenamiento a temperatura ambiente lógicamente no será mayor de unas pocas horas.

El término de **«alimentos de humedad intermedia»** se aplica a un grupo heterogéneo de alimentos cuyos valores de Aw están comprendidos entre 0,60-0,85 que equivalen a contenidos de humedad del 20-40 % y que no necesitan refrigeración para su conservación. Comprenden: frutas secas, determinados productos horneados y carnes y pescados salados, además de mermeladas, jarabes y miel. La alteración del último grupo se atribuye a los osmófilos, microorganismos que crecen a concentraciones altas de azúcar (65-70 %) y que toleran valores de pH bajos (<4,0). Los agentes alterantes más corrientes son las levaduras osmofílicas (*Saccharomyces y Torulopsis sp*.) que fermentan la sacarosa con producción de alcohol. Ciertos mohos se desarrollan en la superficie de mermeladas, como *Aspergillus y Penicillium*. Puesto que los osmófilos son termosensibles y, por lo tanto, fácilmente destruibles durante el procesado térmico, la alteración por estos microorganismos sólo es posible después de una recontaminación, lo que puede ocurrir por un vertido defectuoso o después de abiertos los recipientes que los contienen.

Reacción de Maillard



4. Criterios y Riesgos microbiológicos

Los programas de muestreo en alimentos, son independientes del tamaño del lote siempre que el lote sea lo suficientemente grande en comparación con el tamaño de la muestra. La severidad de un programa de muestreo debe basarse en el riesgo que represente el consumo de un alimento por el consumidor por la presencia de microorganismos patógenos, de sus toxinas y metabolitos tóxicos o por la de microorganismos capaces de deteriorar la calidad del alimento hasta un estado inaceptable. Para la elección de un programa se deben tener en cuenta: el tipo y la calidad del riesgo que conllevan las especies microbianas que se están analizando y las condiciones previsibles de manejo y consumo a las que el lote se someterá tras el muestreo. El plan de muestreo es uno de los componentes del criterio microbiológico y comprende: el procedimiento de toma de muestra y el criterio de decisión a aplicar en el lote de alimentos. El plan de muestreo debe ser económicamente factible. Existen dos tipos de planes de muestreo reconocidos internacionalmente, definidos por la ICMSF: **el plan de dos clases** (por ejemplo: n=5, c=0 / n=5, c=2, m=) y **el de tres clases** (por ejemplo: n=5, c=2, m=10^3, M=10^4) donde:

- **n = número de muestras examinadas de un lote;**
- **m = límite microbiológico que, en un plan de dos clases, separa la calidad aceptable de la rechazable y en un plan de tres clases separa la calidad aceptable de la marginalmente aceptable.**
- **M = límite microbiológico que en un plan de tres clases separa la calidad marginalmente aceptable de la rechazable**
- **c = número máximo permitido de unidades de muestra defectuosas (plan de dos clases) o marginalmente aceptables (plan de 3 clases).**

El plan de dos clases es utilizado generalmente para **patógenos**, mientras que el plan de tres clases es utilizado frecuentemente para el **análisis de indicadores de higiene** donde es posible la cuantificación (en unidades de masa o de volumen) de los microorganismos. Es importante tener presente que en la práctica ningún plan de muestreo puede asegurar la ausencia de un microorganismo determinado. El número de microorganismos encontrado en la muestra analizada puede ser distinta en una parte no muestreada del lote o de alimento. La representatividad de los resultados de laboratorio en microbiología de alimentos depende del número de muestras recolectadas, de si la distribución de los patógenos en el lote es homogénea o no y de si el muestreo es realizado de manera aleatoria / dirigida. La confiabilidad de los resultados obtenidos depende de la técnica seleccionada para realizar el análisis (sensibilidad y especificidad). Los análisis microbiológicos de los productos alimenticios, como así también las demás prácticas de laboratorio, deben estar respaldadas por los datos de pruebas de seguridad de una calidad, de un rigor y de una reproductibilidad suficientes. Los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) se han elaborado para promover la calidad y la validez de los datos de análisis que sirven para establecer la inocuidad de los alimentos. Se trata aquí de un concepto de gestión que abarca la totalidad del proceso de organización, así como las condiciones en las cuales los estudios de laboratorio se planifican, se aplican, se verifican, se registran y se informan. Las Normas ISO 9001 y 17025, regulan internacionalmente las acreditaciones de cada laboratorio y de sus funcionamientos en particular.

En la elaboración de un alimento se pueden identificar una serie de pasos en los que puede producirse la contaminación del alimento por microorganismos o en los que, los microorganismos ya presentes en el alimento pueden multiplicarse con mayor facilidad. Estos pasos del proceso se denominan **"puntos críticos"** (PPCC) y sobre ellos hay que actuar a la hora de mejorar las características microbiológicas del alimento en cuestión. Un producto tiene buena calidad microbiológica cuando sus cargas microbianas son reducidas y constantes (esto es, no presentan variaciones estacionales o de cualquier otro tipo de periodicidad que impiden que el producto sea homogéneo a lo largo del tiempo).

Para lograr un aumento de la calidad microbiológica de un alimento lo que hay que hacer es determinar en la Industria cuáles son los críticos del proceso y evitarlos siguiendo un código estricto de **Buenas Prácticas de Elaboración y Distribución del alimento (BPE)**. La prevención, por tanto, está en evitar manufacturar productos de baja calidad microbiológica y no en comprobar la calidad microbiológica de los ya elaborados (lo que, por otra parte, presenta una relación costo – beneficio muy baja por la gran cantidad de muestras que es necesario analizar).

En el desarrollo de las BPE hay que hacer un análisis del riesgo consistente en determinar el peligro para la salud humana de un factor patógeno presente en un alimento y el medio como puede reducirse ese riesgo hasta valores infinitesimales por medios tecnológicos. Este riesgo depende de la DMI (Dosis Mínima Infectiva) del microorganismo y de los valores del mismo que se encuentren en el alimento; asimismo hay que valorar la carga inicial de microorganismos en cada una de las raciones del alimento, y el número de raciones o partes consumidas por la población en un determinado tiempo. La **letalidad** del tratamiento a aplicar viene dada por la fórmula:

$$\mathbf{l = \log_{10}(N_0/N_c)}$$

donde $\mathbf{N_c}$ son los valores aceptables del microorganismo a controlar y $\mathbf{N_0}$ la carga microbiana inicial para dicho microorganismo. Aplicando estas BPE las oscilaciones en la calidad microbiológica del producto disminuyen y el análisis microbiológico es más consistente puesto que permite detectar alejamientos de las BPE.

El análisis microbiológico de alimentos no tiene carácter preventivo, sino que simplemente es una inspección que permite valorar la carga microbiana. La prevención se logra como se indicó anteriormente. Puesto que el control microbiológico es un proceso analítico es necesario seguir una serie de criterios sobre la toma de muestras y el análisis microbiológico de los productos finales. En este sentido, es necesario considerar:

- la distribución desigual de los microorganismos en los alimentos, lo que hace necesario seguir un esquema de toma de muestras para obtener resultados representativos;
- que el número de criterios utilizados a la hora de juzgar la calidad microbiológica de los alimentos debe limitarse al mínimo necesario para así poder aumentar el número de análisis y
- que los criterios de análisis aplicados han de ser específicos de cada alimento porque son diferentes los microorganismos patógenos y alterantes de cada tipo de alimento.

Un protocolo de análisis de alimentos correcto debe considerar:

- la heterogeneidad de la presencia de microorganismos en los alimentos,
- el proceso de transporte de las muestras del sitio de recolección al laboratorio evitando la multiplicación de los microorganismos presentes o la inactivación de algún microorganismo;
- que es necesario detectar bacterias que suponen entre 10^{-4} y 10^{-7} de la flora normal del alimento, flora ésta inocua, utilizando medios selectivos;
- los tratamientos tecnológicos pueden producir daños subletales en los microorganismos que no pueden, en esas condiciones, volver a ser sometidos rigurosamente a medios selectivos y es necesaria la utilización de medios de recuperación y
- que, en cualquier caso, es necesario realizar una evaluación sistemática de los medios de cultivo para prevenir la variabilidad debida a pequeños errores en la preparación de los medios de cultivo.

El planteamiento del muestreo del alimento es diferente si se trata de un muestreo único (caso de una partida que llega por primera o única vez al centro de control microbiológico) del muestreo repetido. Cuando hay que hacer un muestreo de una partida única de alimento hay que considerar que los datos de mayor importancia los proporcionan las normas de elaboración y conservación del alimento.

Ningún muestreo único puede dar una garantía total de calidad microbiológica del alimento y, como norma general, es conveniente analizar un número de muestras equivalente al 1% si el lote es grande y al 10% si es pequeño. En el caso de un muestreo repetido, un sistema basado en el análisis de 10 muestras al azar y rechazo del lote cuando se detecte una defectuosa obligará al fabricante a establecer medidas de seguridad suficientes para proteger adecuadamente al consumidor. En la rutina de trabajo del laboratorio no siempre es práctico; pensemos en lo engorroso que sería tomar el 10 % de un universo de 1000 latas de conserva, por ejemplo (100 latas). Cada **MUESTRA** estará constituida por la unidad muestral indicada en la tabla correspondientes a un mismo lote (constará de 250g o ml) y se las embalará en forma individual, según CODEX ALIMENTARIUS (interpolar según cada normativa en uso en cada lugar de residencia):

- Numero de envases o unidades del lote: de 1 a 25
- Numero de envases o unidades que deben tomarse: 1 envase o unidad.
- De 26 a 100, 2 envases o unidades y mayor de 100, 5 envases o unidades.

Ahora bien, ¿cómo y porqué se aplica el término de "criterio microbiológico"? Un criterio microbiológico para alimentos define la aceptabilidad de un proceso, producto o lote de alimentos basándose en la ausencia o presencia o el número de microorganismos y/o la investigación de sus toxinas por unidad de masa, volumen o área. Según se detalla en "Principios para el Diseño y la Aplicación de Criterios Microbiológicos Para Alimentos" - Codex Alimentarius Commission, consiste en:

- Señalar el alimento al que se aplicará el criterio,
- elección de microorganismos y/o sus toxinas / metabolitos a identificar y la razón de la elección para el producto,

- un plan de muestreo indicando el número de muestras a tomar, el tamaño de la misma y las características de la unidad analítica,
- los métodos para su detección y/o cuantificación,
- los límites microbiológicos considerados apropiados para el alimento en el punto indicado de la cadena alimentaria,
- el número de unidades analíticas donde se debe verificar el cumplimiento de dichos límites.

Al establecer un criterio microbiológico se tienen que tener en cuenta los siguientes factores:

- Evidencia epidemiológica de que el alimento en cuestión es un vehículo significativo de enfermedad.
- Susceptibilidad del alimento a ser contaminado por patógenos.
- Probabilidad de crecimiento microbiano en el alimento durante su manufactura, almacenamiento, distribución y preparación.
- Tratamiento que recibe el alimento antes de ser consumido (proceso de cocción, etc.).
- La susceptibilidad de los probables consumidores a agentes patógenos y toxinas.

Para establecer un criterio microbiológico se debe definir previamente cual será el propósito del mismo, éste puede comprender la evaluación de:

- La inocuidad del alimento: para este propósito se requiere la determinación de microorganismos patógenos y/o toxinas y en algunos casos la utilización de microorganismos indicadores (relacionados con la presencia de un patógeno).
- El cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).
- La utilidad de un alimento como ingrediente para un propósito determinado.
- La vida útil de un alimento a fin de determinar su fecha de vencimiento.

La evaluación que se hace de la inocuidad de los alimentos y de su aptitud para el consumo humano a través del cumplimiento con el criterio microbiológico designado para el producto en cuestión, puede referir a ausencia de patógenos o a la demostración de la aplicación de Buenas Prácticas de Higiene. La comparación entre los resultados de laboratorio obtenidos y los criterios microbiológicos establecidos puede brindar información importante tanto para el productor / elaborador como para los servicios de inspección en lo referente a la aceptabilidad del producto y / ó proceso. No basta con los criterios microbiológicos para lograr este objetivo, sino que es de suma importancia verificar la aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura u otros sistemas (por ejemplo, HACCP) para asegurar que los microorganismos indeseables sean eliminados o minimizados a un nivel tal que no puedan ocasionar daño a los seres humanos.

En la República Argentina, el Código Alimentario Argentino establece dos categorías principales en cuanto a los criterios a seguir para la elaboración de patrones microbiológicos (provenientes de la Resolución MS y AS N° 003 del 11.01.95- de "Principios Generales Para El Establecimiento De Criterios Y Patrones Microbiológicos

Para Alimentos MERCOSUR" - GMC - RES Nº 059/93):

- **Criterio Obligatorio:** se utiliza para referirse a los microorganismos considerados patógenos y/o sus marcadores, considerados de importancia en salud pública y de acuerdo con la clase de alimento. En este caso su hallazgo constituye razón suficiente para imputar la infracción y proceder en consecuencia, en forma preventiva o represiva, imponiendo las sanciones que correspondan.
- **Criterio Complementario (Recomendatorio):** a diferencia del anterior es el criterio relativo a la evaluación del proceso tecnológico utilizado para la obtención de un producto. Puede orientar al fabricante, aconsejarlo acerca de puntos sin control, y su seguimiento permitirá inferir o determinar la "falla", que se demuestra en los protocolos analíticos. No tiene por finalidad la inspección final, con lo que se indica que de su incumplimiento no derivarán sanciones.

En ese momento se destacará la idoneidad del inspector actuante, quien sugerirá las acciones correctivas y se pondrá a prueba la responsabilidad del elaborador, a quien, de manifestarse remiso a adecuarse, sí se le aplicará la sanción correspondiente. Cuando se evalúa el riesgo microbiológico asociado a un alimento específico todos los microorganismos transmisibles a través de los alimentos deben ser considerados incluyendo bacterias, virus, hongos, levaduras, algas y parásitos.

Criterios microbiológicos en los principales patógenos alimentarios (CODEX ALIMENTARIUS)

Parámetro	Criterio de aceptación				Metodología *
	n	c	m	M	
Recuento de coliformes (NMP/g)	5	2	10	10^2	ISO 4831:2001, BAM-FDA:2001, ICMSF
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	1	10	10^2	ISO 6888-1:1999
Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	5	2	10^2	10^3	ISO 21527- 2:2008 BAM-FDA: 2001, capítulo 18 APHA: 2001
Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	5	1	10	10^2	ISO 15213:2003
Listeria monocytogenes/ 25g	5	0	ausencia		ISO 11290-1:2004; BAM-FDA:2003; USDA-FSIS:2008
Salmonella spp/ 25 g	5	0	ausencia		ISO 6579: 2002; BAM-FDA 2007

Los riesgos asociados como las toxinas/ metabolitos producidos por estos organismos y algunas propiedades intrínsecas (por ejemplo, la resistencia a antibióticos) deben también ser considerados en la evaluación. La presencia de algunos microorganismos en los alimentos no es necesariamente un índice de riesgo para el consumidor. Vegetales y animales son la principal fuente de los alimentos que comemos y se encuentran naturalmente asociados a microorganismos, lo que implica que los alimentos que de ellos se obtengan también estarán asociados naturalmente a microorganismos. Los microorganismos elegidos para la elaboración del criterio deben ser relevantes para el alimento y circunstancias particulares (producto crudo o listo para consumir, perfil del consumidor del producto). Si el criterio establece la búsqueda de microorganismos indicadores, su propósito debe ser detallado claramente (por ejemplo, detectar higiene inadecuada, indicar posible presencia de patógenos).

Es importante tener presente que, mientras para un alimento cocido o listo para consumir la tolerancia para un determinado microorganismo es cero, sí se puede permitir la presencia del mismo en el alimento crudo dentro de ciertos niveles-si éste fuera sometido a un tratamiento previo a su consumo por el cual se eliminará dicho microorganismo (por ejemplo, cocción). En este mismo sentido, la interpretación del resultado es diferente según se trate de producto crudo o producto cocido o listo para consumir. Dentro de los microorganismos que componen un criterio microbiológico se pueden distinguir dos tipos:

a. Organismos indicadores: para la evaluación de la inocuidad microbiológica de los alimentos, la utilización de organismos indicadores es muy frecuente. El análisis microbiológico de alimentos para la búsqueda de estos microorganismos suele utilizar técnicas sencillas y accesibles que permiten evaluar:

- Calidad de la materia prima, problemas de almacenamiento, abuso de temperatura, vida útil *(Recuento de aerobios mesófilos).*
- Potencial contaminación fecal o posible presencia de patógenos *(Escherichia coli, Coliformes fecales)*
- Contaminación por manipulación humana *(Staphylococcus aureus coagulasa positiva)*
- Contaminación post tratamiento térmico *(coliformes, enterobacterias, Staphylococcus aureus coagulasa positiva, estreptococos fecales)*
- Productos metabólicos de patógenos que indican un peligro para la salud *(termonucleasa)*
- Se utilizan para relevar las condiciones a las que ha sido expuesto el producto que pudieran implicar un posible peligro, no necesariamente presente en la muestra analizada, pero que podría hallarse en muestras paralelas.

b. Organismos patógenos: aquellos que pueden encontrarse en el alimento en cuestión que pueden convertir al alimento en un potencial vehículo de enfermedad a quien lo consuma. Los métodos de laboratorio utilizados para la detección o recuento de microorganismos forman parte del criterio microbiológico. La elección del método a utilizar debe privilegiar a aquellos métodos estandarizados y de alta sensibilidad que hayan sido validados por organismos internacionales/ nacionales de referencia. *(Código Alimentario Argentino, Art. 1413 y 1414).*

En los últimos años ha habido avances significativos en el desarrollo de nuevas tecnologías para la detección y la separación de microorganismos de los alimentos. El desarrollo de técnicas moleculares (PCR) e inmunológicas (ELISA) brinda ventajas sobre los métodos tradicionales, específicamente en lo que refiere a velocidad, pero su uso todavía no se ha generalizado. En general, las decisiones a tomar cuando el límite microbiológico establecido en el criterio designado para el alimento en cuestión es excedido, dependerán de los motivos que fundamentaron el establecimiento del criterio. Los límites microbiológicos del criterio pueden ser utilizados para definir la aceptabilidad de materias primas, la adecuación de medidas higiénicas, la posibilidad de contaminación ambiental, la presencia de 'nichos' microbianos en los equipos o la aceptabilidad del producto terminado.

En la mayoría de los casos cuando se analiza el producto final se sabe que los límites se han excedido se tiene cuando ya es tarde. Si se aplican los criterios microbiológicos en determinados puntos del proceso de elaboración para el monitoreo de las condiciones de procesado, cuando se obtienen los resultados, éstos sirven como disparador de acciones correctivas apropiadas en beneficio del producto final. Si alguno de los límites que componen el criterio es excedido, las decisiones deben tomarse según el tipo de peligro que involucre el límite excedido y debe realizarse, en todos los casos, en el contexto de una evaluación integral del proceso.

Si bien en la teoría cualquier alimento perecedero poco ácido puede constituirse en un peligro potencial a la salud si es manipulado incorrectamente, que se desarrolle una enfermedad transmitida por el alimento y la velocidad a la que esto ocurra dependerá de la cantidad y el tipo de contaminante presente. Cantidades pequeñas de *Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens y Bacillus cereus* pueden hallarse en los alimentos sin constituir un peligro directo para la salud del consumidor. Sin embargo, si los alimentos con bajos recuentos de *S. aureus, B. cereus o C. perfringens* son manipulados de manera incorrecta (deficiente refrigeración, por ejemplo) se permitirá el crecimiento de cualquiera de los tres microorganismos pudiendo así constituirse en un peligro directo para la salud: altos recuentos de *S. aureus* o de *B. cereus* puede resultar en la producción de enterotoxinas en los alimentos antes de ser consumidos, mientras que altos recuentos de *C. perfringens* en el alimento previo a su consumo, puede llevar a la producción de la toxina in vivo en el consumidor.

Como bajos recuentos de *S. aureus, B. cereus y C. perfringens* pueden ser hallados en alimentos producidos aplicando las Buenas Prácticas de Manufactura, los criterios para estos microorganismos generalmente reconocen cierta tolerancia ya que el límite establecido en el criterio es tal que incluso si es excesivamente superado, no existe riesgo directo para la salud del consumidor. Sin embargo, debemos tener presente que sí podría existir peligro dada la posibilidad de que por crecimiento previo o manipulación incorrecta del alimento que no se refleje en dichos recuentos (toxina preformada, por ejemplo) que sí constituye un peligro directo para la salud. Si los ensayos para las toxinas preformadas son negativos, debe asegurarse que las condiciones de manipulación sean las adecuadas. Si son positivos, el alimento debe ser destruido.

Si el límite excedido corresponde a un criterio recomendatorio (no existe peligro directo para la salud), el alimento no necesariamente ha perdido su inocuidad. Este criterio permite un margen de discrecionalidad. Sirve para alertar sobre deficiencias en el proceso, distribución, almacenamiento o comercialización. En este punto, debe analizarse una serie de variables, no existiendo linealidad en este proceso, sino que la integración de las mismas y el criterio del investigador determinarán la decisión a tomar. Debe realizarse inmediatamente una investigación integral de las BPM, pudiendo incluirse un nuevo muestreo y poniendo especial énfasis en las prácticas de higiene del establecimiento.

Los datos recolectados en este procedimiento serán la base de la toma de decisión: si existe evidencia de que un punto crítico del proceso no se encuentra bajo control, debe generarse acción inmediata. La evidencia puede referir a las materias primas, a las condiciones microbiológicas de los equipos de proceso, a deficiencias en la manipulación del alimento, a falta de control de temperaturas de almacenamiento / cocción, al hallazgo de microorganismos indeseables en el ambiente de proceso o la condición microbiológica del producto terminado. (Por ejemplo, si el punto que se detectó que no se encuentra bajo control son las materias primas no listas para consumo, el ingrediente no debería ser usado. Si ya ha sido utilizado, su influencia en la inocuidad del alimento debe ser evaluada y medidas apropiadas deben tomarse).

La situación es diferente si tenemos evidencia de que existe un peligro directo para la salud, es decir que el criterio obligatorio ha sido excedido. Nunca debe ser excedido el criterio obligatorio, si esto sucediera requiere de la acción inmediata de la Autoridad de aplicación. Las medidas a tomar pueden ser, según la situación particular, la destrucción, reprocesamiento, redestinación. Los productos involucrados son retirados del mercado generalmente de manera voluntaria por el elaborador (las dimensiones del retiro y la forma de darle publicidad dependerán de la evaluación del riesgo, del tipo de producto, de peligro, entre otros. De todas maneras, si el retiro no es voluntario, la Autoridad Sanitaria debe iniciar el sumario administrativo correspondiente.

La legislación provee alternativas a la destrucción si el producto, por el tratamiento que sufre durante su procesado, al momento de su consumo es inocuo. Cuando se consideran decisiones sobre el destino de alimentos que poseen un peligro directo para la salud, las alternativas diferentes a la destrucción total deben ser analizadas cuidadosamente. El reprocesado del producto está permitido y debería ser considerado si el peligro puede ser eliminado de esta manera (por ejemplo, reconstitución y repasteurización de leche en polvo usada como ingrediente alimentario).

Frecuentemente, los productos que son considerados no aptos para consumo humano pueden ser destinados para consumo animal (por ejemplo, carne, pollo, huevos o lácteos que resultan no aptos para consumo humano son usados como ingredientes en alimento balanceado para mascotas). Este accionar es adecuado sólo si ello no resulta en la perpetuación del problema para la población humana. A continuación, se tratará de ejemplificar la teoría antes expuesta:

Interpretación de resultados microbiológicos en carne picada y alimentos a base de carne picada vacuna, porcina y de aves listos y no listos para su consumo según Criterio Microbiológico en Código Alimentario Argentino

Alimentos involucrados (no listos para su consumo y listos para su consumo):

- hamburguesas de carne vacuna, porcina y de aves,
- salchichas frescas,
- chorizos frescos y
- alimentos elaborados a base de carne picada.

Criterio Obligatorio
Los alimentos que se incluyen en este criterio deben hallarse libres de *Salmonella spp y de Escherichia coli O157:H7/NM*. La determinación es ausencia/ presencia en la cantidad indicada de producto porque ambas bacterias, especialmente la *E. coli O157*, puede ocasionar enfermedad en pequeñas dosis.

Criterio Complementario
La evaluación de la inocuidad de los alimentos no debe realizarse basándose en el análisis de los microorganismos indicadores meramente, sino que es en el contexto de una evaluación integral de los procesos desde el campo hasta la mesa, que se obtienen las herramientas necesarias para asegurar que se ha alcanzado la inocuidad del producto deseada.

Se recomienda que, al hallar recuentos superiores al límite microbiológico considerado en el criterio complementario, *Recuento de Aerobios Mesófilos, Recuento de Escherichia coli, Recuento de coliformes y Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positiva*, se coloque al pie del protocolo analítico una leyenda con las recomendaciones correspondientes. Por ejemplo*: "El valor del recuento de Escherichia coli indicaría prácticas de higiene deficientes en la elaboración y /o conservación inadecuada del producto, se sugiere la revisión de las Buenas Prácticas de Manufactura".*

Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM)

En este tipo de producto, se utiliza para monitorear la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura. El recuento refleja: contenido microbiano de materiales crudos e ingredientes, la eficiencia del procedimiento de elaboración / proceso, la condición de higiene del equipo y utensilios y la relación tiempo / temperatura de almacenamiento y distribución. Alimentos perecederos manipulados correctamente pueden desarrollar RAM elevados y perder calidad si son almacenados por un período de tiempo prolongado. En este caso, el RAM no se encontraría elevado por la condición de higiene del producto, sino por la vida útil del mismo. Por ello es que la utilidad del indicador depende de la historia del producto y el momento de la toma de muestra. En el uso o la interpretación del recuento de aerobios mesófilos hay ciertos factores que deben ser tenidos en cuenta como que, éste recuento es sólo de células bacterianas vivas.

Los procedimientos que sufre el alimento en su elaboración, por ejemplo, un proceso térmico, pueden enmascarar productos con altos recuentos o condiciones deficientes de higiene. Además, el almacenamiento prolongado en congelación o con pH bajo resulta en la disminución del recuento y este recuento no diferencia tipos de bacterias.

Recuento de *Staphilococcus aureus coagulasa positiva*

Los *estafilococos* se encuentran en las fosas nasales, la piel y las lesiones de humanos y otros mamíferos. Se los utiliza como componentes de criterios microbiológicos para alimentos cocidos, para productos que son sometidos a manipulación excesiva durante su preparación y para aquellos que son sometidos a manipulación después del proceso térmico. Generalmente, los *estafilococos* se eliminan durante la cocción. Altos recuentos en alimentos sometidos a procesos térmicos se deben a contaminación posterior a este tratamiento (manipulación, contacto con equipo o aire contaminados y/ o conservación inadecuada del mismo o falta de refrigeración). La presencia de *S. aureus* puede indicar un riesgo potencial para la salud. Un número elevado de *estafilococos* puede indicar la presencia de toxinas termoestables, no obstante, un recuento bajo no significa ausencia de las mismas, ya que una población numerosa pudo haberse reducido a un número más pequeño debido a una etapa del proceso, por ejemplo, calentamiento o fermentación.

Recuento de *Escherichia coli*

El hábitat natural de este microorganismo es el intestino de los animales vertebrados. Los criterios microbiológicos que incluyen *E. coli* son de utilidad en casos en que se desea determinar contaminación fecal. La contaminación de un alimento con *E. coli* implica el riesgo de que puedan encontrarse en el mismo patógenos entéricos que constituyan un riesgo para la salud. Sin embargo, la ausencia de *E. coli* no asegura la ausencia de patógenos entéricos. En muchos productos crudos de origen animal, bajos recuentos de *E. coli* pueden ser esperados dada la asociación cercana de estos alimentos con el ambiente animal y por la probabilidad de la contaminación de las carcasas, reses, etc. con materia fecal animal durante la faena. *E. coli* se puede eliminar fácilmente mediante procesos térmicos, por consiguiente, la presencia de la misma. en un alimento sometido a temperaturas elevadas significa un proceso deficiente o, lo que es más común, una contaminación posterior al proceso atribuible al equipo, manipuladores o contaminación cruzada. Sin embargo, si el objetivo del análisis es controlar la contaminación post tratamiento térmico, los organismos seleccionados deberían ser las bacterias coliformes en lugar de *E. coli*.

Recuento de Coliformes

La presencia de bacterias coliformes o enterobacterias en los alimentos no significa necesariamente que hubo una contaminación fecal o que hay patógenos entéricos presentes. Las bacterias coliformes son particularmente útiles como componentes de criterios microbiológicos para indicar contaminación postproceso térmico. Algunos coliformes *(E. coli)* son comunes en las heces del hombre y otros animales, pero otros *(Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Erwinia)* comúnmente se encuentran en el suelo, agua y semillas.

Generalmente, en la leche cruda, vegetales, carne, aves y otros alimentos crudos se encuentran recuentos bajos de bacterias coliformes naturalmente por lo que presentan poco o ningún valor para el monitoreo de los mismos. Estos organismos se eliminan fácilmente por tratamiento térmico, por lo cual su presencia en alimentos sometidos al calor sugiere una contaminación posterior al tratamiento térmico o que éste ha sido deficiente. Esto debería generar la determinación del punto del proceso donde se produjo la contaminación. Si se obtiene un recuento elevado en alimentos que han sufrido un proceso térmico, debe considerarse que existieron fallas (ausencia o deficiencia) en la refrigeración post-cocción. Los coliformes se estresan subletalmente por congelación, por lo que el recuento de coliformes en alimentos freezados debe ser interpretado con cuidado. El uso del recuento de coliformes como indicador requiere un conocimiento amplio del proceso que al alimento ha sufrido (producción, procesamiento, distribución, etc.) y del efecto que él ha tenido en las bacterias coliformes. A continuación, se enumerarán los artículos 156 tris, 255 y 302 del Código Alimentario Argentino (según la modificación / inclusión por la Resolución Conjunta SPyRS / SAGPyA Nº 79/04 y 500/04), siguiendo el ejemplo propuesto:

Art 156 tris: Los productos preparados a base de carne picada, tales como chacinados frescos embutidos o no embutidos, y otras preparaciones a base de carne picada (albóndigas, empanadas, pasteles, arrollados o similares) precocidas o no, una vez cocidos y listos para consumir, ya sea que se dispensen inmediatamente después de finalizada la cocción, en el establecimiento elaborador o sean enviados a domicilio, deberán responder a las siguientes especificaciones microbiológicas:

Criterio complementario

Determinación	Resultados	Método de Análisis
Recuento de Aerobios Mesófilos/g	n=5 c=2 m=10^4 M= 10^5	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos- Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos- Parte II- Enumeración de microorganismos aerobios mesófilos- Métodos de Recuento en Placa
Recuento de Coliformes /g	n=5 c=2 m=100 M= 500	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos- Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos- Parte II-Bacterias coliformes
E. coli /g	Ausencia/ g	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos- Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos- Parte II-Bacterias coliformes
Recuento de S. aureus coagulasa positiva/g	n=5 c=1 m< 100 M=500	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos- Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos- Parte II-S. aureus- Recuento de estafilococos coagulasa positiva

Criterio obligatorio

Determinación	Resultados	Método de Análisis
E. coli O157:H7/NM	n= 5 c=0 Ausencia /65 g	USDA-FSIS Guía de Laboratorio de Microbiología- capítulo 5 – Detección, aislamiento e identificación de E. coli O157:H7/NM en productos cárnicos o equivalente
Salmonella spp.	n= 5 c=0 Ausencia/ 25 g	Manual de Bacteriología Analítica de FDA (BAM) Capítulo 5 Salmonella o equivalente

Podrán investigarse otros microorganismos cuando las circunstancias lo hicieran necesario.

Art. 255: Con la designación de carne triturada o picada, se entiende la carne apta para consumo dividida finamente por procedimientos mecánicos y sin aditivo alguno. Debe prepararse en presencia del interesado salvo en aquellos casos en los que por la naturaleza del establecimiento o volumen de las operaciones sean autorizados expresamente por la autoridad competente. La carne picada fresca deberá responder a las siguientes especificaciones microbiológicas:

Criterio complementario

Determinación	Resultados	Método de Análisis
Recuento de Aerobios Mesófilos/g	n=5 c=3 m=10^6 M= 10^7	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos-Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos- Parte II- Enumeración de microorganismos aerobios mesófilos- Métodos de Recuento en Placa
Recuento de E. coli/ g	n=5 c=2 m=100 M= 500	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos-Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos- Parte II- Bacterias coliformes
Recuento de S. aureus coagulasa positiva/g	n=5 c=2 m=100 M= 1000	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos-Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos- Parte II-S. aureus- Recuento de estafilococos coagulasa positiva

Criterio obligatorio

Determinación	Resultados	Método de Análisis
E. coli O157:H7/NM	n= 5 c=0 Ausencia /65 g	USDA-FSIS Guía de Laboratorio de Microbiología- capítulo 5 –Detección, aislamiento e identificación de E. coli O157:H7/NM en productos cárnicos o equivalente
Salmonella spp	n= 5 c=0 Ausencia /10 g	Manual de Bacteriología Analítica de FDA (BAM) Capítulo 5 Salmonella o equivalente

Podrán investigarse otros microorganismos cuando las circunstancias lo hicieran necesario.

Art. 302: Se entiende por chacinados, los productos preparados sobre la base de carne y/ o sangre, vísceras u otros subproductos animales que hayan sido autorizados para el consumo humano, adicionados o no con substancias aprobadas a tal fin. Los chacinados frescos deberán responder a las siguientes especificaciones microbiológicas:

Criterio complementario

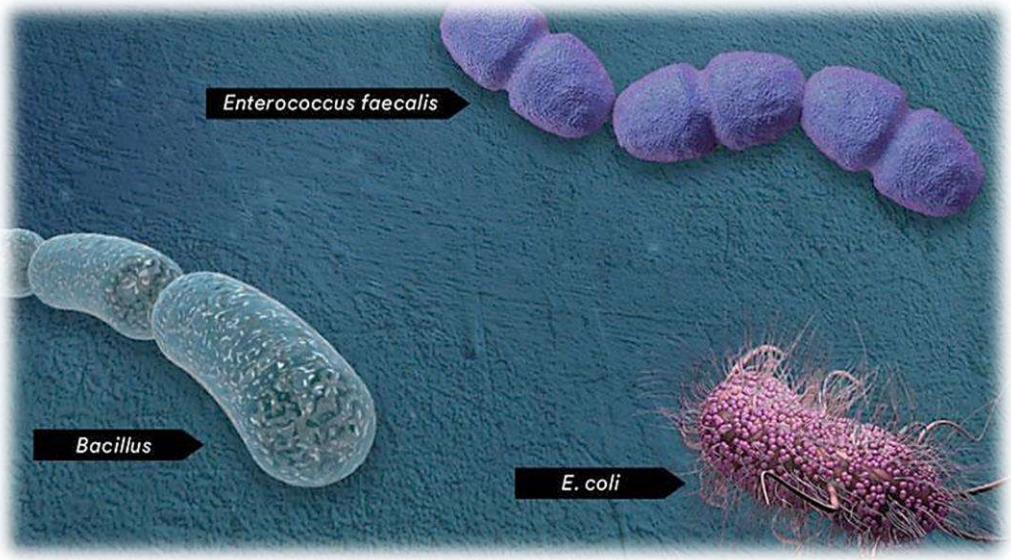
Determinación	Resultados	Método de Análisis
Recuento de Aerobios Mesófilos/g	n=5 c=3 m=10^6 M= 10^7	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos- Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos- Parte II- Enumeración de microorganismos aerobios mesófilos- Métodos de Recuento en Placa
Recuento de E. coli/ g	n=5 c=2 m=100 M= 500	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos- Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos- Parte II-Bacterias coliformes
Recuento de S. aureus coagulasa positiva/g	n=5 c=2 m=100 M= 1000	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos- Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos- Parte II-S. aureus- Recuento de estafilococos coagulasa positiva

Criterio obligatorio

Determinación	Resultados	Método de Análisis
E. coli O157:H7/NM	n= 5 c=0 Ausencia /65 g	USDA-FSIS Guía de Laboratorio de Microbiología- capítulo 5 – Detección, aislamiento e identificación de E. coli O157:H7/NM en productos cárnicos o equivalente
Salmonella spp	n= 5 c=0 Ausencia /10 g	Manual de Bacteriología Analítica de FDA (BAM) Capítulo 5 Salmonella o equivalente

Los organismos indicadores microbiológicos son una importante herramienta en los programas de monitorización ambiental para controlar las condiciones higiénicas en la producción de alimentos. Reflejan las condiciones microbiológicas generales de los equipos y entornos de producción, aportando información clave para validar y verificar los procesos de limpieza e higienización. El término "organismo indicador microbiológico" se refiere a un organismo o grupo de organismos, que reflejan la condición microbiológica general de un alimento, un equipo o un entorno de producción. Su presencia no proporciona información sobre la posible presencia o ausencia de un patógeno específico ni aporta una evaluación del riesgo potencial para la salud pública. Sin embargo, los datos de los programas de monitoreo ambiental en la industria alimentaria que incorporan organismos indicadores son muy útiles para:

- Determinar el estado higiénico de los equipos y entornos de producción
- Entender la ecología microbiana del entorno de producción
- Validar y/o verificar los sistemas de limpieza e higienización
- Verificar el sistema de control del proceso de producción
- Evaluar el riesgo de contaminación posterior al procesamiento.



5. Contaminación microbiana de los alimentos

La industria alimentaria mundial ha progresado a través del tiempo y en la actualidad ante la necesidad de proteger la salud de una población creciente y gracias a los diferentes tratados de libre comercio, es necesario que al consumidor lleguen productos inocuos y de buena calidad. Los principios generales del Codex Alimentarius constituyen una base firme para garantizar la higiene de los alimentos, haciendo hincapié en los controles esenciales en cada fase de la cadena alimentaria, recomendándose la aplicación del sistema de análisis de riesgos y de los puntos críticos de control (HACCP). Este sistema permite determinar riesgos concretos y adoptar medidas para prevenirlos, y de esta manera reduce la incidencia de enfermedades de transmisión alimentaria.

El principal problema lo constituyen las bacterias por su capacidad de reproducirse, hasta cantidades que afectan la salud del consumidor, o de generar toxinas con diferentes mecanismos de acción, lo que ha motivado el interés por adelantarse a futuros escenarios de riesgo para la inocuidad alimentaria mediante la identificación temprana de nuevos peligros en los alimentos. Muchos patógenos no alteran las características organolépticas del alimento y el consumidor confía en lo que está ingiriendo ya que es imposible detectar su presencia por medio de los sentidos, de tal manera que se hace necesario utilizar diferentes métodos y técnicas de cuantificación e identificación para evaluar la calidad sanitaria y comercial del mismo. Algunos microorganismos propios o adquiridos durante el procesamiento, utilizan los diferentes macro y micronutrientes constituyentes de los alimentos, sean estos proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales, aprovechando la cantidad de agua disponible, pH, capacidad oxidorreductora, entre otros aspectos, para sintetizar metabolitos primarios y secundarios, que, al generar cambios en la calidad, genera el rechazo por parte de las autoridades o de la población. Otros, sin embargo, pueden comportarse como patógenos oportunistas, condición que dependerá del estado inmunológico del consumidor. Pueden distinguirse 3 formas de contaminación microbiana: primaria, directa y cruzada.

- **Primaria o de origen**: Se presenta durante el proceso de cultivo, cosecha o fabricación del alimento. En la actualidad es difícil obtener un producto alimenticio libre de microorganismos, por lo cual es aceptable tengan algún nivel de contaminación siempre y cuando no represente un riesgo para la salud del consumidor, lo que implica ausencia de patógenos.
- **Directa**: Es tal vez, la vía más simple, puesto que los contaminantes llegan sin intermediario, por ejemplo, el contacto de alimentos crudos con productos cocidos durante el almacenamiento o el goteo de los jugos de carne sobre los vegetales.
- **Cruzada:** Es el paso de un agente microbiano, químico o elemento físico, desde un alimento o materia prima contaminada a uno que no lo está, a superficies en contacto con este, que se encuentran limpias como mesas, equipos y utensilios. Este mecanismo casi siempre es imperceptible dado que la transmisión es a través de un tercero. Un ejemplo típico es cuando un alimento crudo pone sobre una tabla de cortar y luego en la misma sin lavar y desinfectar se coloca uno cocido o listo para consumir.

Esto, ha motivado el desarrollo de estrategias de monitoreo para identificar, cuantificar y rastrear tanto los consorcios microbianos como la cinética de su comportamiento, de modo que sea posible predecirlo e inferir cuál ha sido, los cuales van desde el cultivo microbiano hasta el uso de herramientas para el análisis de secuencias de ADN y ARN. La transmisión de los microorganismos puede deberse a diversos elementos que contribuyen al ingreso de los mismos al hombre y a los alimentos. Ellos son: Los reservorios o sustratos a partir de los cuales se aíslan con regularidad y en donde suelen sobrevivir durante periodos largos; los fómites, objetos o materiales inertes que circunstancial y temporalmente están contaminados, como los trapos de limpieza y vectores u organismos que pueden traspasar de manera interna o externa, un microorganismo capaz de causar una enfermedad, como por ejemplo, las moscas y las cucarachas.

En la actualidad, el cambio climático ha propiciado modificaciones en el modo de transmisión de algunos patógenos, evidencias reportadas en investigaciones muestran el impacto en el incremento de casos de salmonelosis y campilobacteriosis en Europa, Canadá y Australia. Las fuentes de contaminación de los alimentos pueden ser **naturales** como el agua, la tierra, el aire, los animales, los ingredientes como materias primas de todo tipo incluyendo las especias y el hombre que los contamina antes que sean obtenidos, cosechados o durante su manipulación y tratamiento. Y las que no son naturales o **externas**, como los equipos empleados para su proceso, almacenamiento y conservación, los materiales de empaque, utensilios y aún el mismo operario.

Sin embargo, debe precisarse que lo más probable es que hayan sido contaminados a partir de las naturales, lo cual se favorece cuando los microorganismos encuentran condiciones para estar y permanecer adheridos a materiales inertes, formando biopelículas o biofilms. En consecuencia, según las fuentes y tipo de alimento, hay que minimizar la carga microbiana y establecer protocolos de manejo y controles a lo largo de la cadena de fabricación y no limitarlos al producto final.

Dentro de los tratamientos, se encuentran los térmicos suaves, alta presión, campos eléctricos pulsados, intensos pulsos de luz, aplicación de ácidos orgánicos, dióxido de cloro, solos o combinados, además de la esterilización y la pasteurización. Aunque es posible que un gran número de géneros o especies microbianas se encuentren en la naturaleza, bajo condiciones normales, un alimento solo puede albergar pocos tipos, dentro de los que se incluyen los presentes de forma natural como sucede, en los productos crudos, y los que provienen de fuentes externas a las que se exponen en todas las etapas de producción hasta el consumo. La flora de los alimentos puede ser de dos tipos: Deseable e indeseable. La deseable puede ser a su vez autóctona o natural, de la cual se ha aprovechado su potencial biotecnológico a nivel industrial como cultivo iniciador o "starter" o como fuente de probióticos para el control de patógenos. De la indeseable, hacen parte los microorganismos patógenos y los oportunistas, así como los alteradores o degradadores con acción enzimática que merman su calidad comercial.

Para comprender los principios básicos que rigen tanto su contaminación, alteración, como la conservación, es importante conocer que características de los alimentos y condiciones ambientales favorecen la supervivencia y/o multiplicación en especial de los patógenos. Al llegar un grupo microbiano a la materia prima o al producto, el destino seguido por la flora contaminante de los alimentos responde a tres posibilidades: 1) inactivación, 2) supervivencia o persistencia, o 3) multiplicación o enriquecimiento. Estas alternativas se refieren a la totalidad de la flora microbiana o solo a determinados grupos de gérmenes. Durante la multiplicación, se da lugar a la producción de metabolitos primarios como ácidos, aminoácidos y secundarios como pigmentos, expresándose estos en cambios en el color, textura, olor o sabor, que alteran la calidad comercial. Por otro lado, existen patógenos capaces de excretar toxinas termoestables como es el caso del *S. aureus* y algunas micotoxinas en especial aflatoxinas, que pueden persistir en los alimentos a pesar que los microorganismos no sean detectados.

Según la ruta elegida los alimentos se pueden clasificar en **perecederos, poco perecederos y no perecederos** basados en sus parámetros propios o factores intrínsecos como el pH, la humedad o actividad de agua (aw), el potencial de óxido-reducción (Eh), contenido de elementos nutritivos, componentes antimicrobianos y estructuras biológicas. Como cada grupo microbiano tiene unas condiciones óptimas para su desarrollo y multiplicación, el conocerlas y contrastarlas con las que ofrece el alimento, permite diseñar métodos por parte de la industria, para controlar su presencia durante su fabricación o consumo.

Las condiciones ambientales, por las cuales se obtiene, transforma o mantiene el producto, incidirán en su conservación y calidad, conociéndose como ya vimos, como factores extrínsecos y ellos son: temperatura óptima de crecimiento o almacenamiento, humedad relativa del ambiente, y presencia y concentración de gases. Se define entonces al alimento perecedero, como aquel que, en razón de su composición, características fisicoquímicas y biológicas, puede experimentar alteraciones de diversa naturaleza en un tiempo determinado y que, por lo tanto, exige condiciones especiales de proceso, conservación, almacenamiento, transporte y expendio, en consecuencia, los microorganismos se multiplican en él, produciendo modificaciones enzimáticas que inducen a su rechazo por parte del consumidor.

En dicho alimento, influyen mucho los parámetros intrínsecos característicos del mismo, que, considerados simultáneamente, representan otros tantos modos naturales de preservación de los tejidos vegetales y animales. Una vez determinados, es posible pronosticar los microorganismos que más probablemente se van a desarrollar y, por ende, prever la estabilidad general del producto en cuestión, así mismo, puede ser una ayuda para saber su edad y en algunos casos, la forma en que ha sido manipulado o podría ser manipulado.

Los factores implícitos resultan de la interacción de los intrínsecos y extrínsecos, están representados por las propiedades fisiológicas determinantes del tipo de flora microbiana que puede o no estar en un alimento, información fundamental para impedir o retardar el crecimiento microbiano teniendo en cuenta su ecología global, a través del diseño de estrategias para manipular aquellos de mayor incidencia en la inhibición microbiana. Dentro de estos factores están el estado fisiológico de los microorganismos ya sea que presente un daño subletal, sea viable pero no cultivable o como esporas; el grado de adaptación al sustrato, su velocidad de crecimiento y el tipo de asociaciones microbianas que se presenten sean estas de neutralidad, sinergismo o antagonismo.

La dificultad para recopilar numerosos valores exactos de muchas variables, hace necesario en muchos casos la construcción de modelos matemáticos para predecir el sistema de conservación más apropiado, y esto permitió el desarrollo de la microbiología predictiva, una herramienta útil para garantizar la inocuidad y calidad de un alimento. Los primeros modelos estadísticos tradicionales como el propuesto por Gompertz en1825, se centraban en el crecimiento microbiano a diferentes niveles de pH y aw, de temperatura y concentraciones de preservadores en un medio de laboratorio y en la actualidad se puede tener acceso a través de internet a algunos modelos; siendo los comúnmente utilizados: ComBase; Pathogen Modeling Program; Growth Predictor & Perfringens Predictor y Sym'Previus, que posee una base de datos integrada y un software de microbiología predictiva. Gracias a estas herramientas entre otras, se ha logrado predecir la actividad antimicrobiana sobre patógenos como *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes* a partir de sustratos específicos, estimar la vida útil de alimentos almacenados a diferentes temperaturas con respecto al crecimiento de bacterias como el *B. cereus,* y predecir la duración de la fase de latencia y el tiempo de generación de bacterias patógenas con un mejor rendimiento predictivo sobre los métodos estadísticos tradicionales, entre otras aplicaciones.

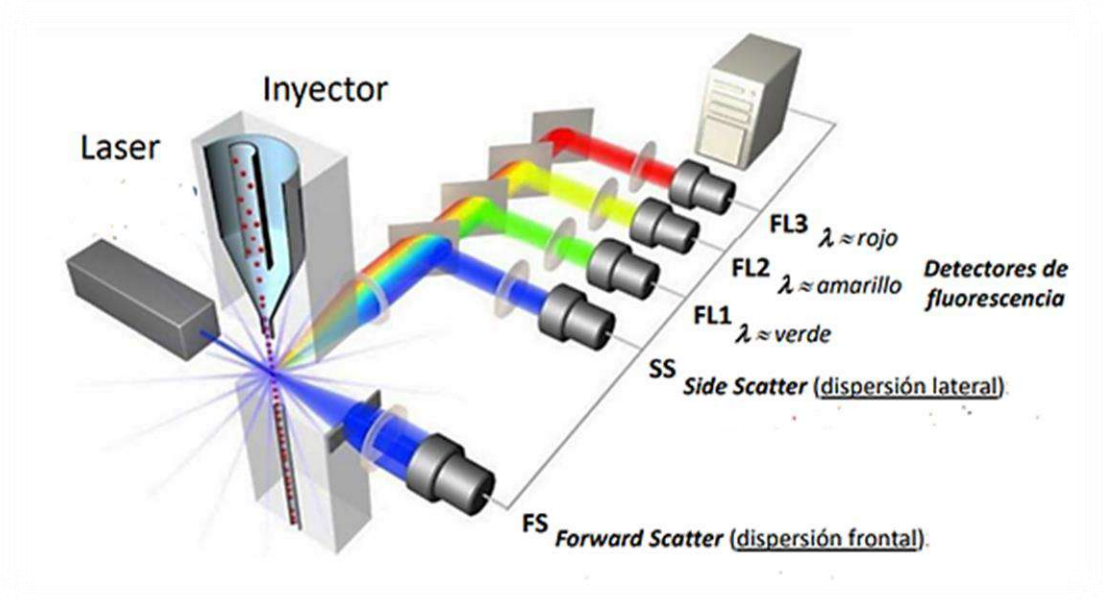
Entonces, inferimos que las ETAs bacterianas, micóticas y virales, son resultado del consumo de alimentos y de agua contaminados con bacterias patógenas viables (o esporas en el caso del botulismo infantil) o productos que contienen toxinas de bacterias y mohos, como así también virus. Con base en las características de la enfermedad, se pueden dividir de manera arbitraria, en tres grupos: intoxicación o envenenamiento, infección y toxiinfección. En la **intoxicación**, el cuadro clínico se debe al consumo de toxinas bacterianas preformadas o de micotoxinas, no siendo necesario que tengan células viables cuando son consumidos para que se presente la enfermedad. Los síntomas aparecen pronto y a veces solo 30 minutos después de la ingestión, excepto con las micotoxinas y no hay fiebre.

Los microorganismos asociados a intoxicaciones son el *S. aureus* que produce una enterotoxina termoestable en productos generalmente manipulados por varias personas o expuestos a temperaturas inadecuadas y el *Cl. botulinum* que secreta una neurotoxina en frutas y verduras poco ácidas, pescados fermentados y conservas caseras elaboradas a partir de materia prima contaminada con las esporas. En la **infección**, la enfermedad es el resultado del consumo de alimentos y agua contaminados por bacterias o virus enteropatogénicos, que estén viables con capacidad de establecerse y multiplicarse en el tracto digestivo del consumidor. Por lo regular, los síntomas ocurren después de 24 horas, lo que depende del patógeno, que puede ser o no de naturaleza entérica. Los síntomas entéricos son locales, se deben a infección del tracto digestivo y al efecto de las toxinas, incluyen dolor abdominal, diarrea algunas veces acompañada de sangre, náusea, vómito y fiebre; causada por *Salmonella, Shigella, E.coli* enteropatogénica (EPEC), *V. parahaemolyticus*, *C. jejuni* y *Y. enterocolitica*. Los síntomas entéricos o no, se presentan cuando patógenos como *Listeria monocytogenes, E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *V.vulnificus* y virus de la hepatitis A, o sus toxinas pasan por el intestino, pero dependen de qué otros órganos o tejidos internos invaden o afectan, y van acompañados de fiebre y cuadros gastrointestinales. Los alimentos asociados están relacionados con contaminación fecal-oral, en especial vegetales contaminados por aguas servidas; las salmonelosis con carnes de aves y huevos más que todo, y la EHEC, con los productos cárnicos más que todo de origen bovino.

Por último, en la **toxiinfección**, los problemas de salud son por la ingestión de un gran número de células viables de bacterias patógenas presentes en agua y alimentos contaminados, las cuales esporulan, colonizan o mueren y liberan toxinas responsables de los síntomas de la gastroenteritis, como el *C. perfringens, B. cereus, V. cholerae y E. coli* enterotoxigénica (ETEC), en mayor concentración que los de la flora que causa infecciones. Los alimentos asociados son diversos; en el caso de *C. perfringens y* ETEC están aquellos contaminados con materia fecal como productos cárnicos y vegetales; *V. cholerae* con heces de enfermos que contaminan aguas, aguas salobres o productos de origen marinos y *B. cereus*, principalmente en cereales o vegetales contaminados con las esporas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que, en países en desarrollo, las ETA son la principal causa de morbimortalidad, asociadas a una carga socio-económica significativa y alrededor del 70% de las diarreas es por la ingesta de alimentos contaminados, según sus estadísticas, en Europa y las Américas, en el período 2013-2022 , se presentaron cerca de 100 mil brotes de origen alimentario.

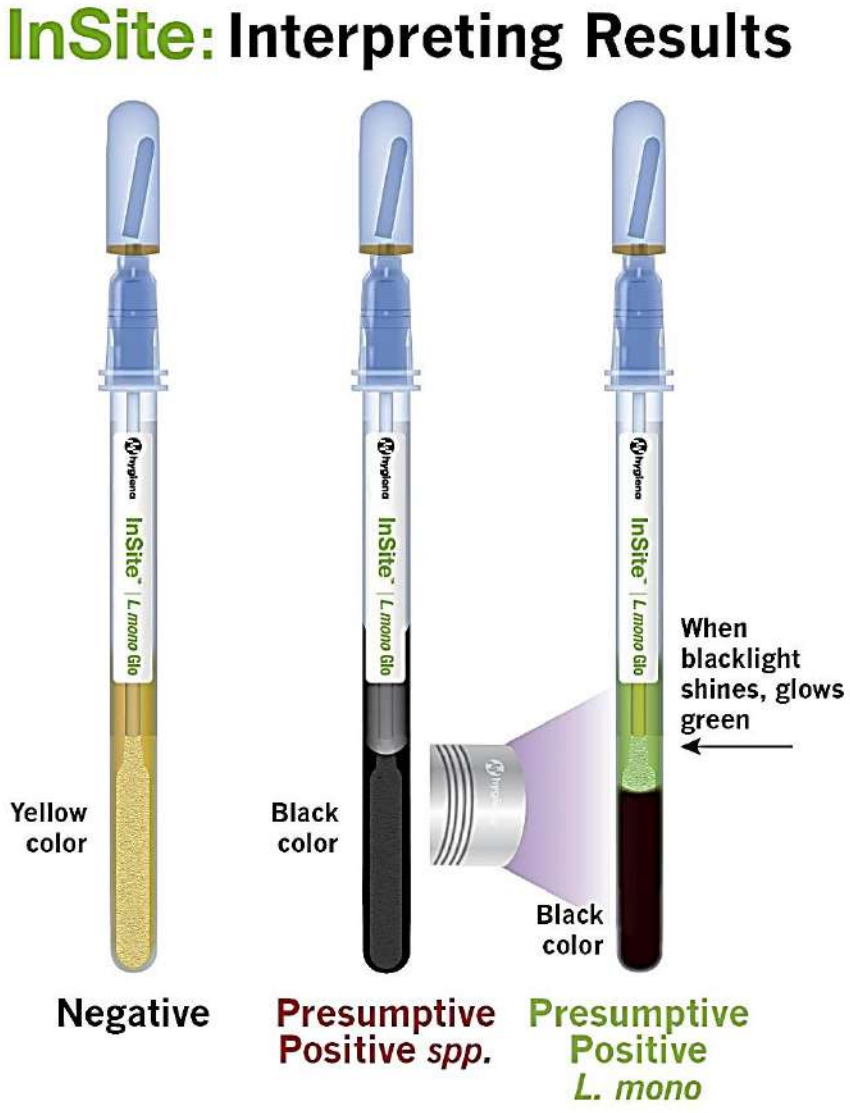
Hay un aumento significativo en la aparición de las ETA debido a las nuevas tendencias nutricionales que apoyan el consumo de comida cruda y fresca, productos secos e ingredientes exóticos, siendo la mayoría de los brotes por *Salmonella*, toxinas bacterianas, virus y *Campylobacter, Shigella, E.coli*, productora de toxina shiga (STEC) O157:H7, *Vibrio, Yersinia* y *Listeria monocytogenes*, con una mayor prevalencia en productos de origen animal, desde crudos, como pescado y carnes, hasta listos para el consumo; no identificándose investigaciones relacionadas con otras bacterias causantes de ETA; siendo casi todas encaminadas a la búsqueda de microorganismos en el producto final y no a lo largo de la cadena productiva.

Asimismo, cabe aclarar, que la presencia de microorganismos en los alimentos, no significa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior en estos productos, sin embargo, por el hecho que la mayoría de los estudios se han realizado sobre productos finales, es necesario evaluar a lo largo del proceso, o sea, desde la materia prima hasta el producto final, identificando además, si hubo problemas durante el procesamiento a nivel de equipos, ambiente, operarios y empaques, y para lo cual se hace uso de los recuentos de indicadores y la búsqueda de la presencia o ausencia de patógenos. El examen microbiológico rutinario para detectar patógenos y sus toxinas no es practicable en muchos laboratorios; no obstante, es imperativo realizarlos siempre que la información epidemiológica o de otro tipo que se disponga, sugiera o haga pensar en la presencia de un agente específico en un determinado alimento. Adicionalmente a los métodos tradicionales, están los métodos rápidos que buscan acortar el tiempo de respuesta, uno de los retos objeto de mayores innovaciones tecnológicas, como la citometría de flujo que permite la detección de patógenos y otros microorganismos contaminantes sin necesidad de hacer cultivos de modo que la muestra puede ser analizada directamente. Con dicha citometría de flujo en conjunto con técnicas fluorescentes, por ejemplo, después de realizar una clarificación de la muestra removiendo los lípidos y proteínas, se puede hacer la detección de bacterias viables y no viables en la leche lo que convierte a esta técnica en un método de análisis rápido que puede ser incorporado a la rutina de un laboratorio.



Como dijimos, el aumento de contaminación en los alimentos, va de la mano con los cambios en los sistemas de producción debido a la elevada presión por parte de las empresas procesadoras de alimentos por conseguir altos rendimientos, la agricultura y ganadería **"orgánica"**, el aumento en el comercio internacional y la aparición de nuevos productos debido a las exigencias del público y de la población vulnerable como ancianos, infantes, inmunosuprimidos y embarazadas. Asimismo, malos hábitos en la cocina y malas prácticas de manufactura y producción, han llevado a las empresas procesadoras de alimentos y a las instituciones reguladoras, al desarrollo actual de estrategias para controlar a lo largo de las etapas del procesamiento, los diferentes peligros y factores de riesgo asociados en especial los microbiológicos, para garantizar el consumo de productos inocuos para la población.

A toda esta problemática, hay que agregar que muchas de las pruebas para el estudio microbiológico aprobadas, se centran en la búsqueda de indicadores y patógenos en etapa final y no durante el proceso, con resultados en 3, 4 y más días, por lo que es una gran necesidad contar con nuevas tecnologías rápidas, mejores y más accesibles. Existen en el mercado métodos rápidos, pero en su mayoría son costosos o no se aceptan como pruebas de referencia, sin embargo, cada vez son más utilizadas, aun cuando por lo general se usan acompañadas de las pruebas tradicionales, porque el objetivo de las empresas es garantizar la inocuidad de sus productos. Pero hay muchos casos que requieren de una vigilancia continua por parte de las entidades reguladoras, con posibilidades siempre limitadas, para controlar todos los alimentos que se fabrican o expenden, en especial aquellos que se ha demostrado son mal manejados en sitios donde el consumidor accede de manera directa, con el riesgo que esto que conlleva para la salud, quien es importante en toda la cadena alimenticia, por tanto debe exigir calidad, aprender a adquirir y dar manejo adecuado a lo q consume, para lo cual la educación es esencial.



A pesar de la existencia de múltiples pilares y herramientas en los que los procesadores de alimentos pueden confiar (legislación, políticas, estándares y directrices de inocuidad de los alimentos relacionados con la implementación, controles y auditorías de sistemas de inocuidad de los alimentos y programas de capacitación de trabajadores), los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos continúan ocurriendo, en todo el mundo, a un ritmo mayor. Esto se traduce en costosas emergencias de salud pública, retiros de productos alimenticios y una pérdida de confianza del consumidor en los procesadores y marcas de alimentos.

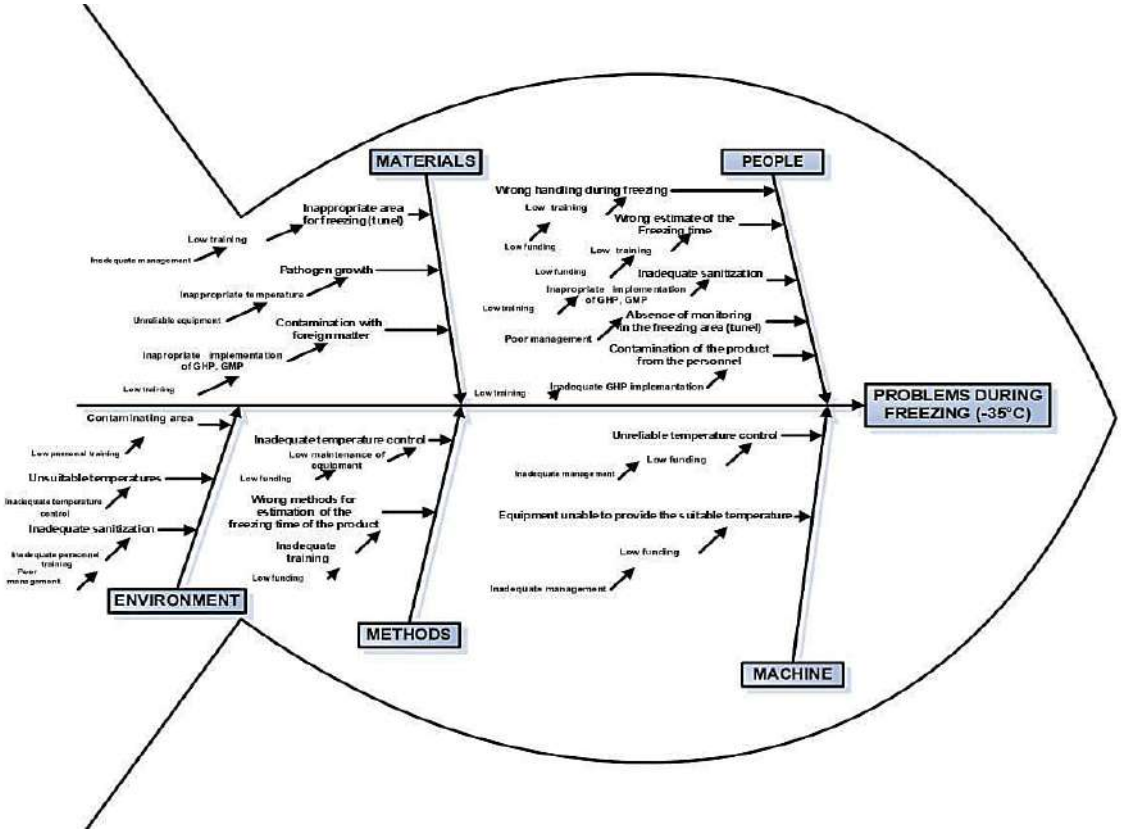
La mayoría de los informes epidemiológicos en curso y posteriores al brote, emitidos por agencias nacionales e internacionales de inocuidad alimentaria y salud pública, revelan la alta incidencia entre los procesadores de alimentos que no aprenden, adoptan, implementan y mantienen un Sistema de Gestión de Seguridad Alimentaria (SGSA) junto con una fuerte cultura positiva de seguridad alimentaria dentro de sus organizaciones. La falta de implementación de herramientas de seguridad alimentaria disponibles es la expresión gerencial de la falta de compromiso hacia la implementación de un SGSA y una cultura positiva de seguridad alimentaria. Estos se manifestarán más tarde, en cascada, en el área de procesamiento y el comportamiento de los trabajadores, lo que aumentará posteriormente el riesgo de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos.

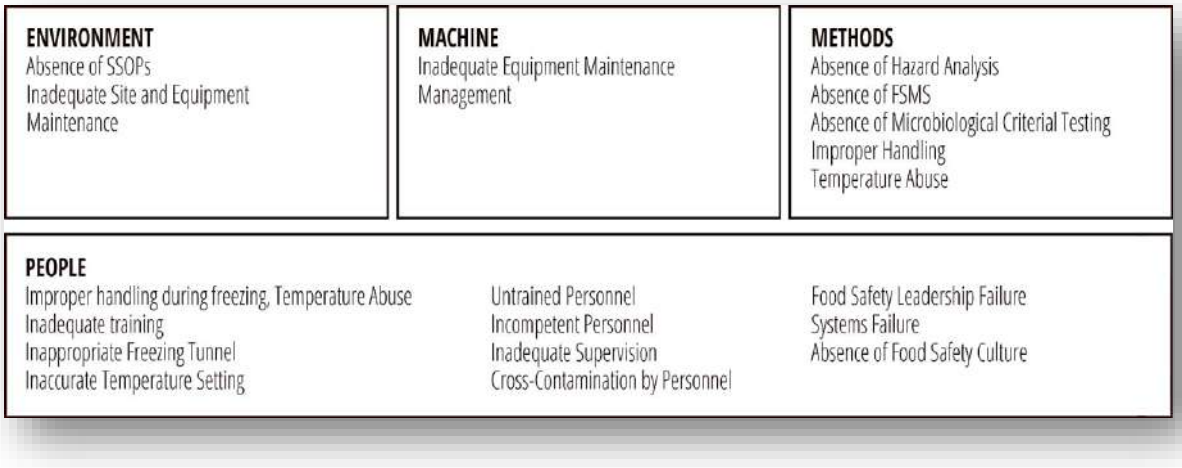
Un ejemplo ilustrativo que deseo presentar, es un brote de listeriosis relacionado con helados en los EEUU de una marca muy afamada mundialmente en 2015. Si bien el helado puede parecer un producto seguro, especialmente en función de sus características de procesamiento y almacenamiento, los incidentes recientes de brotes de listeriosis debido al consumo del mismo contaminado con *Listeria monocytogenes* han aumentado según en CDC.

En general, la contaminación del helado con *Listeria spp,* puede tener lugar a través del entorno de la planta del fabricante debido a procedimientos de saneamiento inadecuados, durante el almacenamiento corto de la mezcla de helado no congelada en condiciones de refrigeración y durante el transporte a los minoristas. También se ha observado un alto riesgo de listeriosis cuando se producen helados novedosos con diversos ingredientes, tales como: masa de galletas triturada o sándwiches de galletas y nueces, ingredientes que no pueden tratarse con calor, como paso de muerte, después de la adición al producto final. Independientemente de las lecciones de seguridad alimentaria ofrecidas por brotes anteriores de listeriosis relacionados con helados, incluido el caso del brote de listeriosis de 2015, que se discutió e investigó a fondo en los años posteriores, otros brotes de listeriosis de helados han surgido recientemente en los Estados Unidos con retiradas de productos. Las enseñanzas que dejan y que luego trataremos más en profundidad, son:

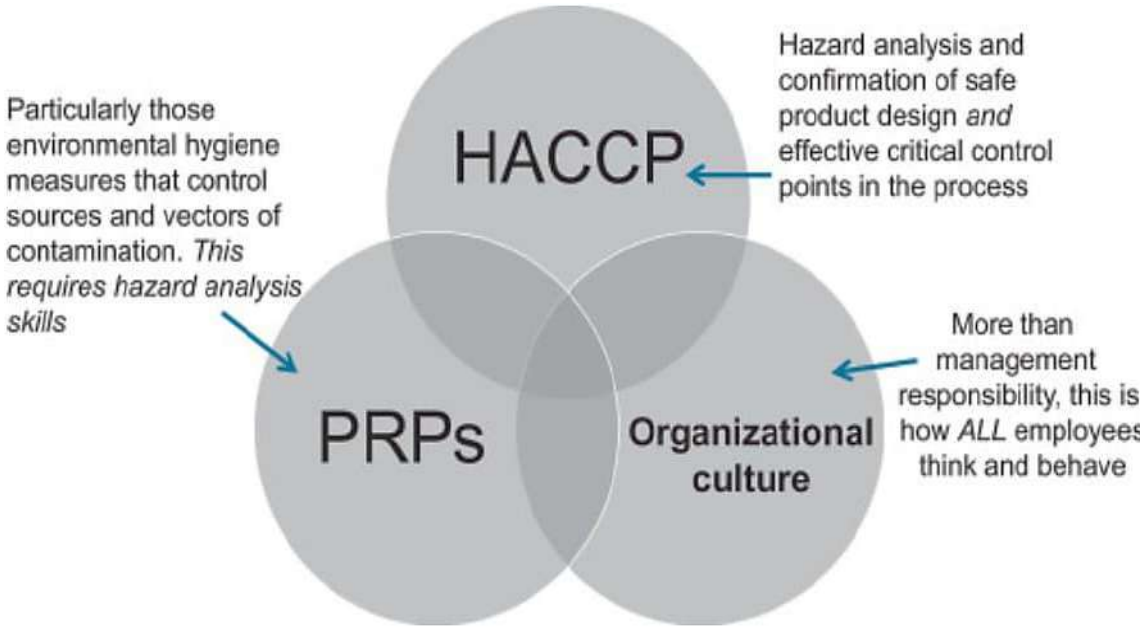
- Entorno de procesamiento y trabajadores, que pueden abordarse mediante la implementación adecuada de programas de requisitos previos (PRP) como Buenas Prácticas de Fabricación (GMP), Buenas Prácticas de Higiene (GHP) y Procedimiento Operativo Estándar de Saneamiento (SSOP)
- La falta de pruebas microbianas de productos in situ, lo que indica una falta de implementación de los criterios microbianos para el producto.

Las causas raíz identificadas anteriormente representan una clara indicación de que los fabricantes no abordaron adecuadamente, antes o durante el procesamiento, una herramienta importante de seguridad alimentaria: el diagrama de espina de pescado / diagrama de Ishikawa.





HACCP es una herramienta para desarrollar, implementar y verificar un SGSA. En la prevención de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, los Programas de prerrequisitos o PRP, son la base de un HACCP funcional y viable. Tanto HACCP como PRP requieren un enfoque gerencial de pensamiento sistémico durante el proceso de desarrollo, implementación y verificación.



Los PRP son componentes fundamentales de un programa de seguridad alimentaria de clase mundial. Tradicionalmente considerados como el apoyo fundamental para HACCP, ahora percibimos cómo los PRP también desempeñan un papel activo e indirecto en la defensa alimentaria, la prevención del fraude alimentario y la tecnología e ingeniería de procesamiento de alimentos seguros. Funcionan simbióticamente con HACCP como un sistema de control preventivo (PC). Los PRP son aplicables en todas las etapas de la cadena de suministro mundial de alimentos y, a su vez, comprenden buenas prácticas de mitigación para el cultivo, la cosecha, la fabricación, el almacenamiento, la distribución, el comercio minorista, el servicio de alimentos y la industria artesanal.

Los retiros asociados con patógenos como *Listeria* o *Salmonella*, son causados más a menudo por fallas de PRP (contaminación cruzada posterior al proceso y / o entornos de producción insalubres), en lugar de la falla o mala gestión de puntos críticos de control (CCP) en un plan HACCP. El reciclaje deficiente / eliminación de desechos y la limpieza inadecuada de equipos e instalaciones causan aumentos en el deterioro y la contaminación de los alimentos. Las condiciones sanitarias inferiores en las áreas de procesamiento de alimentos y la manipulación antihigiénica de los alimentos se suman al almacenamiento y transporte deficientes de los alimentos, lo que resulta en la venta y distribución de alimentos antihigiénicos o inseguros. La actividad de la población de plagas o insectos aumenta el riesgo de contaminación y deterioro de los alimentos.

Las BPM están diseñadas para controlar el riesgo de contaminación de los alimentos con suciedad, suciedad, escoria, alérgenos, biopelículas, productos químicos, partículas microbianas y otros medios durante el procesamiento de alimentos. La causa más frecuente de contaminación es la contaminación cruzada de alimentos por parte de trabajadores y manipuladores. Una buena higiene del trabajador alimentario (GHP) es necesaria porque la limpieza y el comportamiento de los trabajadores determinan el nivel de riesgo de contaminación cruzada del trabajador a los productos alimenticios y las superficies en contacto con los alimentos. La seguridad alimentaria actualizada, la higiene de los alimentos y la capacitación de los trabajadores de manipulación de alimentos son de suma importancia para producir alimentos seguros.

Los SSOP están escritos para garantizar las condiciones sanitarias en las instalaciones de alimentos. Los procedimientos SSOP son específicos de una planta, pero también pueden ser similares a las plantas de las mismas categorías o similares del sector alimentario. Todos los procedimientos de SSOP deben estar adecuadamente documentados y validados. Cuando los SSOP de la instalación se encuentran en una etapa de desarrollo, las GMP actuales podrían ayudar como guía para la instalación de alimentos. En general, existe un acuerdo entre académicos e investigadores sobre dos aspectos principales de la calidad de los alimentos: objetivo y subjetivo. El primero se refiere a las características físicas de un producto y está relacionado con el control de calidad y la tecnología alimentaria. Este último refleja la evaluación y los juicios de los consumidores con respecto a las características de calidad percibidas del producto. En cualquier caso, si bien la calidad de los alimentos es un concepto inherentemente complejo y multifacético, definitivamente tiene la seguridad alimentaria en su núcleo.

Siendo la variable más esencial para la calidad de los alimentos, la seguridad alimentaria está regulada para garantizar que los consumidores compren productos alimenticios que cumplan con sus expectativas de seguridad. Para implementar controles de calidad y seguridad alimentaria, es necesario tener un monitoreo en tiempo real en puntos críticos del proceso. Los métodos de análisis rápidos y precisos son vitales para garantizar la calidad y seguridad del producto, así como el cumplimiento del etiquetado. La detección rápida de agentes de deterioro como bacterias, patógenos y otros contaminantes microbianos en la producción y procesamiento de alimentos es necesaria para reducir el deterioro y asegurar un suministro seguro de alimentos.

6. Biopelículas o Biofilms

A lo largo de la historia de la microbiología, investigadores han encontrado que las bacterias crecen en forma diferente después de su adhesión en superficies y posterior formación de biopelículas. En 1964, Mitchell y Kevin Marshall examinaron los primeros estados de formación de biopelículas por bacterias y diferenciaron la adsorción reversible e irreversible, esta última constituyendo el primer estado de formación de las biopelículas. Aunque las descripciones de las biopelículas han variado a través de los años, las características fundamentales se han mantenido y las que se encuentran en la naturaleza consisten en comunidades de microorganismos primarios viables y no viables protegidos por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) polianiónicas fijadas a la superficie.

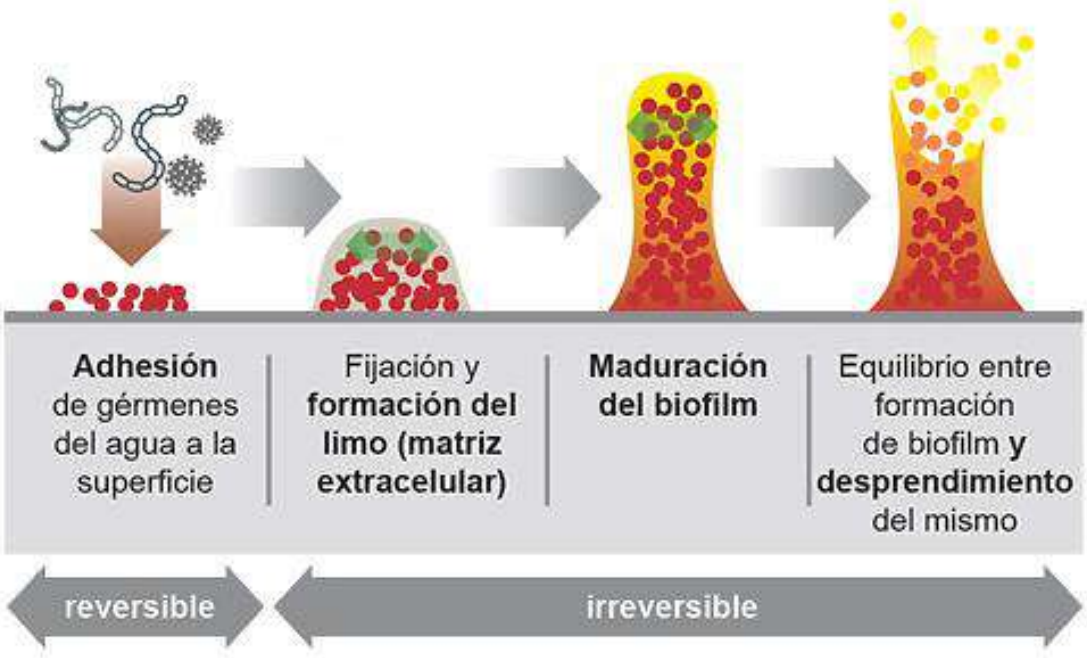
Las EPS pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, ácidos teicoicos y otras sustancias poliméricas hidratadas con un porcentaje de agua entre 85 y 95%. Las EPS protegen a los microorganismos que hacen parte de la biopelícula contra agentes antimicrobianos, previenen al acceso de biocidas, secuestrantes metálicos, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes. Dependiendo del tipo de células involucradas en la biopelícula, las microcolonias pueden estar compuestas por 10-25% de células y 75-90% de matriz EPS. Los requisitos para el crecimiento de la biopelícula son la presencia de microorganismos y el sustrato; si alguno de estos no se encuentra disponible, la biopelícula no se formará, por ende, la sinergia existente dentro de la comunidad del biofilm, será el factor que permita que éste soporte condiciones adversas y pueda sobrevivir.

La presencia de cepas resistentes a los desinfectantes aplicados puede representar un desafío económico para la industria alimentaria además de tener implicaciones en la salud humana. Por ejemplo, existen cepas de Staphilococus spp hacia los amonios cuaternarios, concretamente que más del 13% de las cepas eran resistentes al cloruro de benzalconio. En otro estudio realizado con Listeria monocytogenes aislada de una industria alimentaria observaron que el 4% de las cepas aisladas eran tolerantes a la concentración mínima inhibitoria (MIC 3 µgml-1) y un 13% eran resistentes (MIC 4-7 µg/ml) a los amonios. Pseudomonas spp. a menudo se encuentra en las superficies y equipos de la industria alimentaria. Se considera una importante bacteria alterante de los alimentos y su persistencia al medio se puede explicar por su capacidad de formar biofilms y su elevada resistencia intrínseca hacia los desinfectantes. La resistencia de las Enterobacterias a los desinfectantes generalmente es menor que la de *Pseudomonas spp*.

El uso de desinfectantes puede conducir a la selección de cepas bacterianas que son intrínsicamente resistentes a los agentes antibacterianos aplicados. Además, la exposición a desinfectantes en concentraciones subletales produce una resistencia más estable. Es importante diferenciar una respuesta inducida por un estrés, la cual es reversible de la adaptación que produce una resistencia más estable a los desinfectantes. En condiciones de laboratorio la adaptación de los microorganismos se estudia mediante la exposición de los mismos a concentraciones de desinfectantes gradualmente más altas.

En condiciones reales la adaptación ocurre en los nichos de difícil acceso en los cuales el desinfectante queda en bajas concentraciones. En resumen, las bacterias pueden adquirir resistencia más alta a los desinfectantes a través de la adaptación, adquisición de elementos resistentes a nivel genético, respuestas de estrés o formación de biofilms. Para evitar la aparición de las resistencias es necesario aplicar los principios básicos y elementales de la higiene entre ellos: realizar una buena limpieza antes de la desinfección, utilizar la concentración y el tiempo de contacto adecuados y finalmente aclarar y secar las superficies tras la desinfección que en muchos casos puede prevenir la aparición de resistencias bacterianas. Una posible solución a los fenómenos de resistencia es la rotación entre distintos desinfectantes que no estén relacionados o la aplicación de concentraciones del desinfectante más altas. En esencia, esta práctica conlleva que, cada cierto tiempo, dependiendo del tipo de contaminación y la extensión de la misma, se cambia el tipo de desinfectante creando un ciclo con dos, y preferiblemente con tres, productos de desinfección diferentes.

En los últimos, ha ido creciendo la percepción de que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente en una forma unicelular o libre, como las estudiadas en el laboratorio, sino que la gran mayoría se combinan en grandes colonias limosas donde los diversos microorganismos establecen relaciones y dependencias. Esta percepción ha constituido un punto de partida para incitar a investigar más acerca de las propiedades físicas y químicas de los biofilms, la caracterización de su morfología, y sus formas de desarrollo. Los biofilms son comunidades complejas de microorganismos embebidas en una matriz de polímeros extracelulares, fijas a una superficie, que pueden presentar una única especie o un abanico de especies diferentes.



Se pueden encontrar biofilms en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Necesitan un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes, porque pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas.

Desde un punto de vista tecnológico, algunos biofilms pueden desempeñar una función beneficiosa cuando forman parte de biorreactores para la obtención de productos fermentados. Sin embargo, su presencia puede ser perjudicial e indeseable puesto que en muchos casos producen contaminaciones del producto acabado, que se traduce en una disminución del periodo de conservación y/o en la transmisión potencial de enfermedades, producen una reducción del flujo, de la transmisión del calor, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de las membranas y corrosión de metales, entre otros problemas. Las principales fases de desarrollo de las biopelículas, son:

Acondicionamiento: el biofilm bacteriano empieza a formarse cuando alguna célula individual se adhiere inicialmente a una superficie. La capacidad de adhesión de los microorganismos a un sustrato depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas.

Adsorción y fijación: el proceso de adhesión se da en dos fases; una primera fase reversible, seguida de una segunda fase irreversible. La fase reversible es una unión débil de la bacteria con el sustrato. En ella actúan fuerzas de Van der Waals y fuerzas electrostáticas e interacciones hidrófobas. Durante la unión reversible, las bacterias siguen mostrando movimientos brownianos y se pueden eliminar de manera sencilla con una suave limpieza. La segunda fase, irreversible, es dependiente del tiempo, resulta del anclaje de los apéndices celulares y/o de la producción de polímeros extracelulares. En esta fase las bacterias sintetizan la matriz de exopolisacáridos para establecer un contacto físico entre las células y la superficie. Una vez establecido, las células bacterianas se multiplican dando lugar a microcolonias y posteriormente el biofilm. Durante el proceso de adhesión, las bacterias cambian su fenotipo y llegan a ser básicamente diferentes respecto a cuando están en forma libre, estado conocido con el nombre de **células planctónicas (de plancton)**. De modo que se produce la expresión de genes específicos, se producen cambios y alteraciones en su morfología y cambian su tasa de crecimiento. Teniendo en cuenta este proceso, la matriz de exopolisacáridos es uno de los componentes principales que interviene en el mecanismo de adhesión de los microorganismos. Para la unión irreversible entre la célula y la superficie es necesario un tiempo de contacto mínimo. Si bien, en general, el espacio temporal para el desarrollo de un biofilm es corto y varía en función de la temperatura, disponibilidad de nutrientes y presencia de antibióticos. En este sentido, varios estudios indican que las uniones irreversibles llevan de 20 minutos a 4 horas a una temperatura de entre 4 y 20^{o}C.

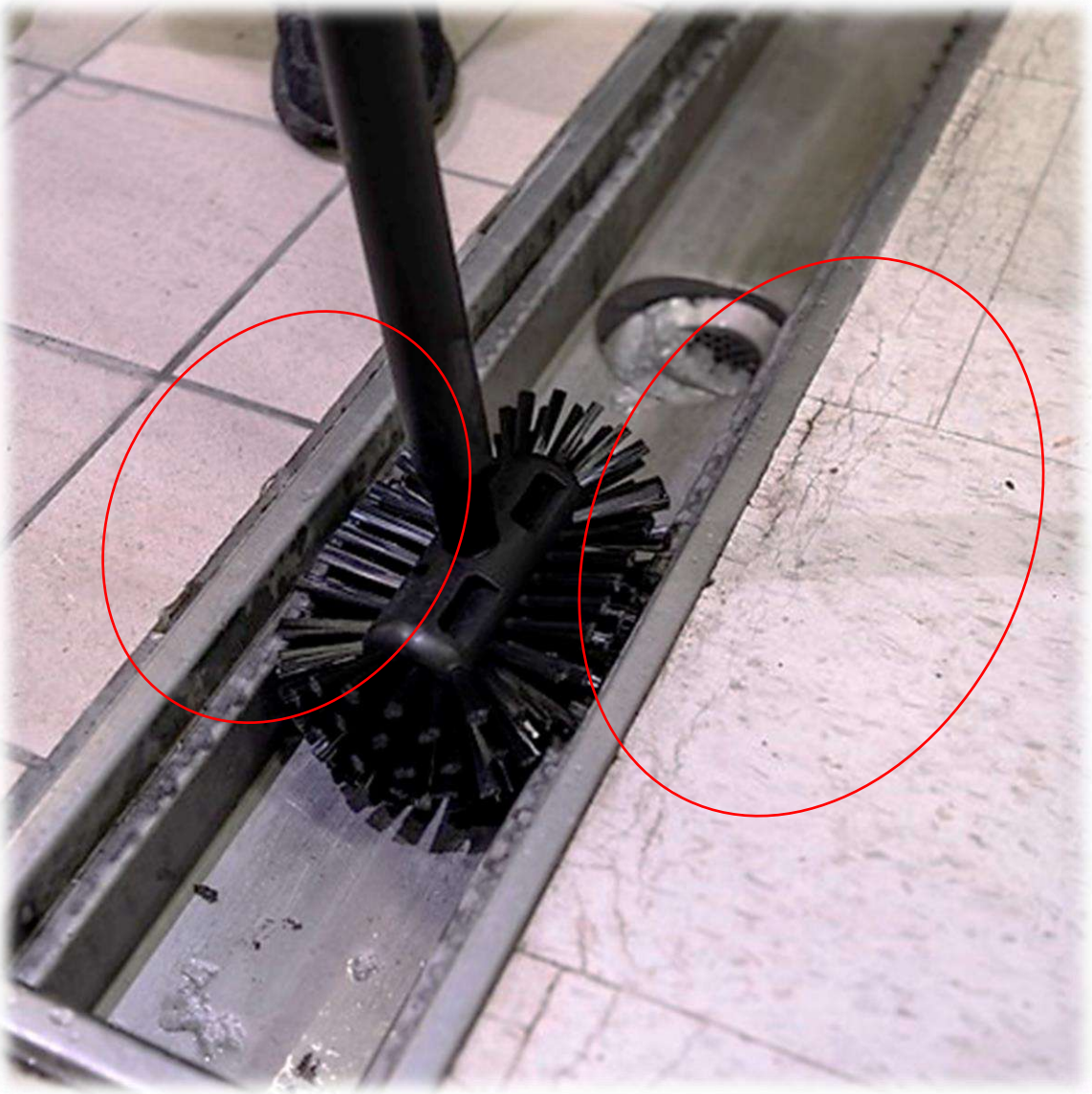
Evolución y maduración del biofilm: la secuencia de unión de diferentes especies bacterianas influye en la composición del biofilm resultante. La población inicial que se une puede cambiar las propiedades de la superficie y así, las que vienen después se pueden adherir vía asociación célula a célula. En algunos casos, la unión de unas segundas especies puede incrementar la estabilidad de la población del biofilm, por ejemplo, está demostrado que Listeria monocytogenes era más propensa a adherirse al acero en presencia de Pseudomonas spp. Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente del biofilm, por naturaleza, desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le llama maduración.

Un biofilm maduro puede consistir en una simple capa de células, en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o embebidas por las sustancias poliméricas extracelulares. A medida que madura el biofilm, se adapta a los nutrientes, al oxígeno y los cambios poblacionales, formando microcolonias discretas separadas por canales de agua. Algunos de los factores que afectan al desarrollo del biofilm, incluido las propiedades de la superficie y de la interfase, son:

- ✓ La disponibilidad de nutrientes.
- ✓ La composición de la comunidad microbiana.
- ✓ La disponibilidad de agua.
- ✓ La interacción interespecífica.
- ✓ El transporte celular.

En los diversos medios donde se encuentran los microorganismos, se dan situaciones de abundancia e incluso de exceso de nutrientes, y situaciones de austeridad y falta de nutrientes. Esta última situación se da en el agua potable, especialmente en los sistemas de agua de alta pureza, donde las bacterias activan estrategias propias de cada especie. Unos microorganismos cambiarán su cubierta para hacerla más hidrófoba y dirigirse hacia las paredes; otros irán moviéndose directamente con sus flagelos o pili, y otros caerán al fondo por gravedad. En la superficie donde lleguen habrá alguna molécula orgánica o mineral que permita un cambio energético mínimo. Las partículas del entorno o las de la misma superficie pueden suministrar el sustrato inicial, puesto que las bacterias como es el caso de *Legionella spp,* son capaces de obtener nutrientes de las tuberías o del revestimiento interno del sistema hídrico.

Legionella spp puede obtener trazas de metal a partir del acero inoxidable, concretamente el hierro es un mineral esencial para su desarrollo y crecimiento. Los microorganismos oligotrofos serán los primeros en colonizar una superficie, y les seguirán aquellos que han evolucionado para encontrar y unirse a las superficies con tal de incrementar sus posibilidades de captar nutrientes. El tipo de sustrato influye en las características de unión. Las bacterias tienden a unirse al cristal (superficie hidrófila) uniformemente en una capa, mientras que en las hidrófobas como el nylon tienden a unirse en grupos. El acero inoxidable se usa frecuentemente como material para la cocina y las instalaciones industriales porque es resistente a los golpes, a la corrosión, dura mucho tiempo y es de sencilla fabricación, además de ser estable, inerte y de fácil limpieza. A escala microscópica se observa como el acero presenta diminutas oquedades que no se ven macroscópicamente, lo cual permite una mayor retención de bacterias por el incremento del número de puntos de adhesión. Las superficies rugosas acumulan suciedad y son de más difícil limpieza que las lisas. En consecuencia, los defectos de las superficies proporcionan protección a la suciedad y los microorganismos, lo que hace que las bacterias supervivientes puedan volver a multiplicarse y formar un biofilm. Además, una vez allí, algunos microorganismos en los biofilms catalizan reacciones químicas y biológicas, causando corrosión del metal. Los biofilms y las bacterias adheridas a la superficie pueden resultar entre 10 y 100 veces más resistentes que las bacterias en suspensión. Hay dos hipótesis que pueden explicar esta observación: La primera de ellas se basa en la actuación del biofilm como una barrera de difusión.



En rojo, zonas deterioradas anexas a un drenaje o desagüe que son ideales para desarrollo de biopelículas

La difusión del desinfectante es inversamente proporcional a su peso molecular, además dependiendo de la naturaleza química del desinfectante puede interactuar con macromoléculas del biofilm perdiendo su eficacia. La segunda hipótesis es que las bacterias dentro del biofilm sufren alteraciones fisiológicas confiriéndoles más resistencia frente los desinfectantes, aunque también depende de la naturaleza del mismo. La eliminación de los biofilms no es una tarea fácil puesto que factores como la temperatura, el tiempo, y las fuerzas mecánicas y químicas intervienen de manera directa en el proceso de des adhesión. De modo que la desinfección tras la eliminación del biofilm es requerida en las plantas de alimentación sobre todo en aquellas zonas donde queda humedad, puesto que se favorece las condiciones de crecimiento de los microorganismos.

A pesar de que todas las bacterias tienen la capacidad de formar biofilms hay algunos géneros que lo forman más fácil y rápidamente como: Pseudomonas, Enterobacter, Flavobacterium, Alcaligenes, Staphylococcus, Listeria y Bacillus. En un ambiente de procesado de alimentos, la flora es probable que sea una mezcla de muchas especies.

Sin embargo, hoy en día no se conoce bien si la flora presente en las superficies y en el ambiente de una industria de procesado es fruto de un fenómeno de selección natural. El conocimiento de la flora bacteriana residente en las instalaciones en el ambiente de una planta de procesado de alimentos sería información valiosa para el diseño del programa de limpieza y desinfección. En contraposición a los alimentos, en los que se ha investigado mucho sobre su ecología microbiana a lo largo de los últimos años, existe un vacío de información respecto a las superficies que contactan con dichos alimentos. Como hemos mencionado anteriormente es frecuente hallar microorganismos en el interior de las grietas, recovecos, puntos ciegos de circuitos, juntas y un sinfín de lugares que la mayoría de las veces el operario olvida (no se contemplan) al realizar el control de superficies, y sin embargo son puntos de control críticos en materia de higiene de instalaciones. La industria alimentaria realizaba exámenes microbiológicos, de forma rutinaria, sobre las materias primas y el producto acabado con el fin de controlar la calidad y la seguridad del producto, y sobre las superficies, equipos, utensilios y personal manipulador, para controlar la efectividad de la higiene aplicada durante el proceso.

En la actualidad este procedimiento se considera obsoleto puesto que el problema de hacer análisis de producto final es que se detecta el problema, pero no se pueden identificar las causas. Los biofilms son comunidades complejas de microorganismos capaces de colonizar y adherirse sobre casi cualquier tipo de superficie formando biopelículas. En realidad, se trata de estructuras tridimensionales donde los microorganismos están envueltos por una matriz constituida por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y agua. Esto facilita que en su interior las células se protejan del estrés ambiental e interactúen entre sí, facultando su proliferación. La amenaza de estas estructuras microbiológicas es doble. Por un lado, por que producen el deterioro de productos o superficies en las que se desarrollan. Por otro, cuando están formados por microorganismos de naturaleza patógena, son motivo de gran preocupación en la industria alimentaria.

Los biofilms de microorganismos patógenos más preocupantes para la seguridad alimentaria son aquellos en los que están presentes microorganismos como: *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Mohos toxigénicos, Salmonella spp., Pseudomonas spp., Campylobacter spp o Bacillus spp.* El biofilm constituye una fuente de contaminación crítica y difícil de eliminar debido a su alta resistencia a los procedimientos de limpieza y de higiene convencionales. Los biofilms pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los desinfectantes, biocidas y antibióticos que las células libres. Generalmente, las técnicas utilizadas (swabs, esponjas, placas de contacto) subestiman el Nº de microorganismos en una superficie. Esto es debido a que no arrastran el biofilm completamente y como consecuencia de ello se obtienen resultados engañosos que normalmente esconden niveles de contaminación mucho mayores. El problema fundamental es que obvian las condiciones especiales que estas estructuras proporcionan a los microorganismos que los componen y únicamente evalúan la eficacia de las sustancias biocidas frente a un cultivo de microorganismos en suspensión, de células libres. Además, no tienen en cuenta las condiciones de aplicación de los productos en condiciones reales. Sin embargo, la ciencia y el desarrollo, evolucionan, por ello, las soluciones innovadoras para el control y eliminación de los biofilms pasan por:

- El cuidado y el desarrollo de estrategias de diseño higiénico de procesos: nos referimos a las acciones preventivas que permitan disponer de unas condiciones de trabajo higiénicas de manera que se minimice el riesgo de contaminación del producto. Por ejemplo, ángulos que faciliten la limpieza, evitar zonas muertas, uniones estancas e higiénicas, maquinaria autodrenable, etc.
- Sistemas de gestión eficaz de limpieza y desinfección: Se tiende a que todos los equipos se mantengan en adecuado estado de conservación removiendo los residuos y suciedades que puedan ser fuente de contaminación.
- Monitorización y análisis riguroso de la estructura y topografía de los biofilms: Para ello es necesario analizar la composición en cuanto a microorganismos y sustancias que los sostienen, así como la disposición y viabilidad celular. Hay para ello, nuevos métodos como: marcadores fluorescentes; observación microscópica de biofilms y sensores de superficie y biosensores.

Las deficiencias en los procesos de limpieza y desinfección, originados por una disminución de la frecuencia de higienización, presencia de puntos de difícil acceso, diseño higiénico deficiente de las instalaciones, falta de pericia de los operarios, etc., propician la presencia de restos de suciedad y la aparición de biofilms.

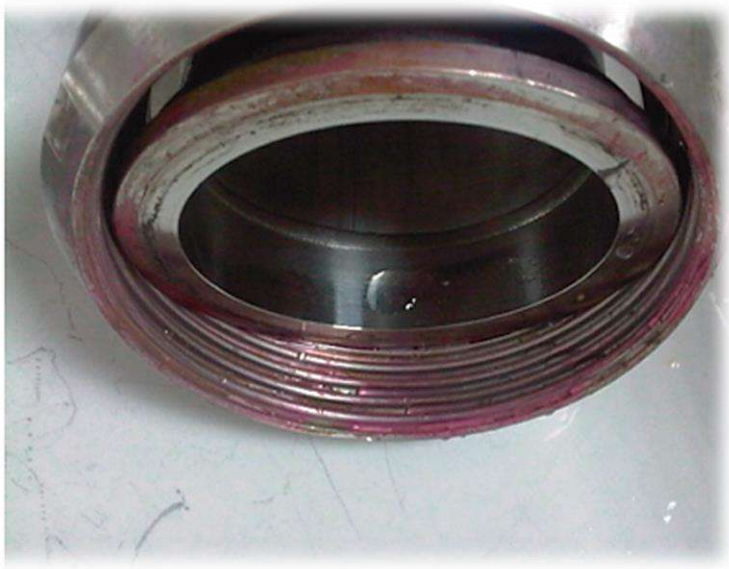
En un primer momento están constituidos por unas pocas capas de células bacterianas con uniones inicialmente débiles a las superficies y en el transcurso del tiempo, se adhieren más fuertemente e incrementan su biomasa, así como el número de especies microbianas que lo constituyen hasta alcanzar el rango de un **biofilm multiespecie maduro,** que actúa como reservorio de microorganismos patógenos, entre ellos *Listeria monocytogenes*. Esta bacteria ha demostrado su habilidad para colonizar biofilms formados originariamente por otros microorganismos, como Pseudomonas spp., y constituirse en parte relevante de dicho biofilm.

A partir de estos reservorios, los microorganismos patógenos pueden expandirse al resto de la instalación, tanto a zonas de no contacto directo con el alimento como a áreas de elevado riesgo donde se elaboran productos listos para el consumo. La dispersión de los microorganismos y de porciones del biofilm puede verse favorecida por las propias operaciones de limpieza, por ejemplo, al aplicar agua a presión excesiva y con boquillas inadecuadas que generan salpicaduras y aerosoles. Los microorganismos que han formado parte de un biofilm pueden haber adquirido características fenotípicas diferentes a las células originales, desarrollando cierta capacidad de adaptación a bajas concentraciones de los biocidas utilizados en la planta.

Esta situación puede presentarse en zonas donde se ha enjuagado el desinfectante y se ha producido un encharcamiento en el suelo (grietas, ranuras, desagües). La presencia de los biofilms en la instalación, y su relación causa-efecto con la presencia de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes y Salmonella spp*, hace imprescindible que, entre las estrategias de control de estos patógenos, una de las destacadas sea el control de dichas biopelículas y el establecimiento de procedimientos de detección y eliminación de las mismas. La detección de biofilms y la determinación de las zonas propensas a su desarrollo tiene, pues, una gran importancia para garantizar la inocuidad de los alimentos que se elaboran. En la práctica diaria, en las industrias alimentarias se emplean diversos métodos y técnicas para verificar la higienización correcta, como el uso de placas de contacto con medios selectivos, bioluminiscencia, etc.; sin embargo, estas técnicas no detectan la matriz del biofilm sino la presencia de microorganismos, materia orgánica, residuos de proteínas, o suciedad orgánica.

Como ejemplo válido y como corolario de este tema, la empresa **BETELGEUX-CHRISTEYNS** desarrolló el **Test TBF300**, que es un sistema rápido, simple y específico para teñir exclusivamente la matriz del biofilm, no interfiriendo en los resultados la presencia de restos de suciedad procedente de productos lácteos, cárnicos o pesqueros. Con esta técnica, pueden visualizarse las zonas con presencia de biofilms y de este modo establecer procedimientos con productos específicos para su control. Según fotografías adjuntas, vemos que se han podido determinar los puntos críticos con presencia de biofilms y establecer procedimientos que han conseguido su eliminación, controlando de este modo la presencia de contaminación microbiológica.

En este estudio realizado, hubo ejemplos de circuitos cerrados y otro en superficies abiertas. Se notificó la presencia de contaminación microbiológica en envases de bebida refrescante. Esta contaminación no se presentaba en todos los envases o lotes, sino que se manifestaba de forma discontinua. Este tipo de contaminación es un indicio indirecto de la posible presencia de biofilms, que son arrastrados (las porciones desprendidas y los microorganismos presentes en el biofilm) por el flujo de la bebida en circulación y depositados en los envases. Se procedió al desmontaje de secciones del circuito, para su inspección visual y aplicar el test de detección TBF 300. Se apreció una coloración rosada persistente, en determinadas uniones y codos del circuito, lo que demostró la presencia de matriz de biofilm, y que estos puntos pueden ser reservorios de microorganismos.



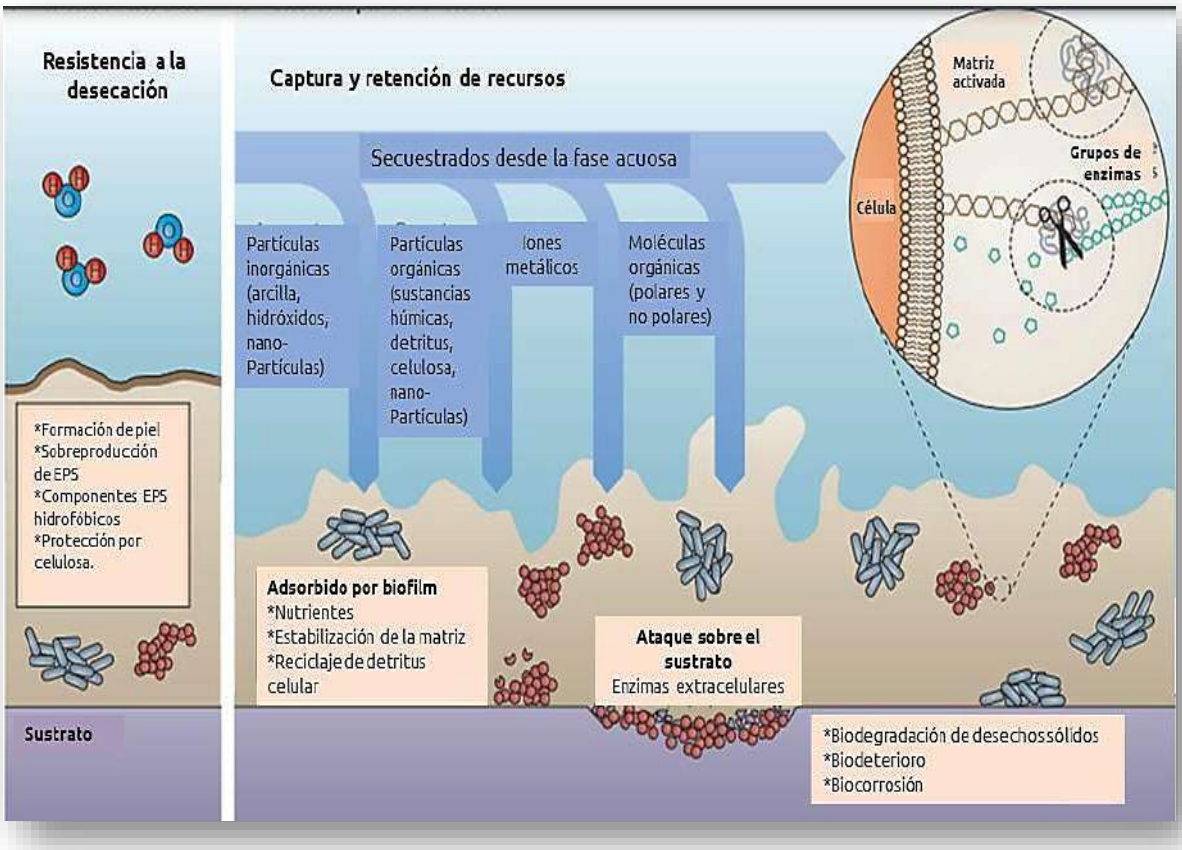
Se implementó un procedimiento para el control de biofilms, consistente en la recirculación, después de una fase inicial de enjuague y limpieza alcalina, a la dosis del 3% durante 3 horas. Posteriormente, se efectuó un enjuague con agua hasta eliminación de residuos. Tras la realización de los tratamientos no se detectó presencia de biofilm y los resultados microbiológicos realizados por la empresa determinaron la ausencia de contaminación microbiológica en el producto final en sucesivas fabricaciones. Se instauró un protocolo preventivo incorporando, al procedimiento de limpieza y desinfección habitual, el tratamiento periódico de los circuitos con dicho detergente alcalino.

En ocasiones se ha notificado por parte de diferentes industrias alimentarias la presencia de contaminación microbiológica inaceptable en producto final, incluso con presencia de *Listeria monocytogenes*. Al abordar el problema, la primera etapa del estudio consiste en la determinación de las causas, relacionadas en gran parte con la presencia de biofilms en las superficies que entran en contacto directo con el alimento en proceso.

En las siguientes fotografías, pueden observarse resultados positivos a la presencia de biofilms, en diferentes superficies de industrias alimentarias (cuchillas, drenajes y tolvas de mezclado) que se establecieron, tras los ensayos microbiológicos pertinentes, como la causa de contaminación del producto final por microorganismos alterantes y patógenos.

Las esponjas húmedas utilizadas en la preparación de alimentos, en las cuales se depositan comúnmente los microorganismos, son un ejemplo de estas fuentes de contaminación y además, son capaces de transferir esos agentes patógenos a las superficies de acero inoxidable, en donde sobreviven por varios días. En tanto que *Bacillus cereus* puede sobrevivir en condiciones extremas y multiplicarse en forma de esporas, las cuales pueden germinar y crecer sobre superficies y alimentos procesados.

Los nutrientes, el agua limitante, el diseño de equipos y el control de temperatura son aspectos importantes en el control de la biopelícula. Es muy frecuente, que las variables mencionadas anteriormente, no se puedan cambiar, por tanto, el control de la biopelícula queda reducido a la efectividad de la limpieza que se realice sobre las áreas y equipos de proceso. La limpieza puede estar acompañada por el uso de químicos o la combinación de efectos físicos y químicos. Los agentes químicos de limpieza suspenden y disuelven residuos de los alimentos por la disminución de la tensión superficial, emulsificación de grasas y peptización de las proteínas. En la mayoría de las plantas de proceso de alimentos, las superficies de contacto con los alimentos son limpiadas y sanitizadas diariamente, sin embargo muchas otras superficies como los tanques de almacenamiento y los exteriores de las bombas, paredes, y techos no presentan un plan de limpieza efectivo.



7. Diseño higiénico sanitario de las plantas de alimentos

Hace tiempo, el procesado de los alimentos se realizaba, generalmente, de forma discontinua y a pequeña escala, tratándose cada día un número variado de lotes. La duración de la jornada laboral venía impuesta, con frecuencia, por la disponibilidad de materias primas o por la demanda de los consumidores y los componentes de la instalación se limpiaban a mano, una vez terminado el trabajo, con los agentes de limpieza de que entonces se disponía, de ordinario sólo agua y jabón. No eran infrecuentes la contaminación y el deterioro de los alimentos por causas microbiológicas y, lo que es más grave, su contaminación con microorganismos patógenos, capaces de producir brotes de toxiinfecciones alimentarias.

Más recientemente, ha aumentado mucho la escala de las operaciones de procesado de numerosos alimentos. Las operaciones discontinuas se llevan a cabo sobre partidas más voluminosas y, en muchos casos, las operaciones continuas han reemplazado a las técnicas discontinuas, para aumentar la productividad. Se ha generalizado el funcionamiento de la fábrica durante las 24 horas del día y se han ido sustituyendo gradualmente los métodos de limpieza tradicionales por los de limpieza in situ o en el lugar (CIP). Los problemas de contaminación microbiológica de las actuales instalaciones de gran capacidad son exactamente iguales a los que se daban en las de antaño, pero mucho mayores. Por lo tanto, la adulteración y el deterioro de los alimentos, cuando se dan, no afectan a unos cuantos kilos, sino a muchas toneladas de producto y, si aparece un brote de ETA, lo más probable es que afecte a un número mucho más elevado de consumidores.

Las exigencias de la higiene tienen que ser muy tenidas en cuenta en el diseño de una planta o fábrica de alimentos. El diseño higiénico incluye el de la instalación, los equipos y los edificios (tanto en lo que se refiere a su construcción como a su distribución), la provisión de servicios (agua bacteriológicamente aceptable y dispositivos para la eliminación de residuos) y la planificación e instalación de medios para la limpieza y esterilización de las materias primas, los aparatos y la propia fábrica. Entre los factores de diseño higiénico que se han de tener en cuenta, a lo largo de todo el proceso que conduce a la puesta en funcionamiento de una fábrica, cabe citar:

- La selección del emplazamiento.
- El diseño de los edificios que albergarán el equipo de procesado.
- El diseño y distribución de los aparatos.

Para seleccionar correctamente un futuro emplazamiento y entre las exigencias higiénicas importantes a estas alturas del proyecto, se encuentran:

- La disponibilidad de un suministro satisfactorio de agua, adecuada para las necesidades que la producción pueda plantear, y de instalaciones para eliminar tanto los residuos sólidos, como los líquidos.
- Ausencia de posibles fuentes de polución por los residuos de otras actividades industriales, como vertederos y corrientes fluviales utilizados por otras factorías para eliminar sus residuos.

Estas posibles fuentes de contaminación son frecuentes en las zonas industriales y pueden dificultar la selección del emplazamiento. Deben evitarse las áreas pantanosas y las tierras con mucho arbolado, porque albergan roedores e insectos y constituyen lugares apropiados para la multiplicación microbiana.

Las materias primas suelen llegar a la fábrica contaminadas, por lo que, generalmente deben someterse a operaciones preparatorias, previas al procesado. Las hortalizas, por ejemplo, llegan contaminadas con tierra, materia extraña, bacterias, etc. Las zonas en las que se manipulan productos muy contaminados deben segregarse de las otras zonas de procesado. Una planificación cuidadosa de estas áreas evitará la posterior aparición de problemas de contaminación. Convienen edificios de una sola planta, cuando son importantes las consideraciones higiénicas, ya que permiten prescindir, en grandes sectores, de pilares de soporte, lo que, a su vez posibilita una utilización más eficaz del suelo y una mejor limpieza e iluminación.

Además, este tipo de edificios facilita la manipulación y el transporte de los productos. Las superficies de las paredes de las salas de procesado deben estar pulidas y ser de fácil limpieza. Tienen que estar exentas de grietas y rugosidades, que sirven de cobijo a insectos y facilitan el crecimiento microbiano. Deben preferirse los materiales de superficie dura, como las baldosas esmaltadas y otros materiales de construcción, como los ladrillos, el cemento, la madera, etc.; deben revestirse con una capa que soporte la acción del vapor de agua, los ácidos y las disoluciones alcalinas ordinariamente utilizadas en la industria alimentaria.

En los salientes de las paredes, los alféizares de las ventanas y los entramados del techo, se depositan polvo, salpicaduras de los productos alimenticios y otras sustancias perjudiciales. Estas superficies deben ser curvas y dotadas de una pendiente que aminore la contaminación y facilite la limpieza y el drenaje después del lavado. Hay que evitar las esquinas y grietas; las esquinas inevitables, como, por ejemplo, las que forman los pisos y las paredes, deben ser curvas e impermeables al agua. Los falsos techos pueden albergar polvo, roedores e insectos y complican la ventilación y el alumbrado, por lo que deben evitarse.

Los pisos, al igual que las paredes, se deben construir con materiales impermeables, de fácil limpieza y exentos de hendiduras y oquedades. Deben ser capaces de soportar los pesos y cargas a los que se les va a someter, así como de resistir el desgaste por el uso, cualesquiera que sean las condiciones previsibles de trabajo que se presenten. Deben resistir a todos los productos químicos que previsiblemente vayan a entrar en contacto con ellos. Los pisos que vayan a recibir grandes cantidades de agua durante el procesado y la limpieza deben tener una pendiente que permita su fácil drenaje. Se debe evitar a toda costa el encharcamiento, ya que el agua pronto se convertirá en fuente de contaminación. Suele ser conveniente una pendiente de 2 cm por metro lineal. Los desagües deben quedar ventilados hacia la atmósfera exterior y hallarse provistos de rejillas que impidan el acceso de los roedores a la fábrica. Los pisos lisos suelen ser muy resbaladizos cuando están mojados, constituyendo un riesgo para la seguridad del personal, en especial cuando use botas protectoras de caucho. Existen en el mercado materiales antideslizantes que permiten conseguir suelos de superficie continua, carentes de hendiduras y oquedades.

Es importante disponer de una ventilación adecuada. Una ventilación escasa favorece la condensación que, a su vez, promueve el crecimiento microbiano en paredes y techos. La mejor forma de proporcionar ventilación a los autoclaves y las calderas de cocción consiste en colocar una campana encima de los mismos, para recoger los vapores y conducirlos al exterior por tubos situados a lo largo del techo. Debe diseñarse de forma que evite la acumulación de suciedad y, a ser posible, que tenga forma cilíndrica; hay que proveer al sistema de ventiladores, si se considera necesaria la ventilación forzada. Las salidas del sistema de ventilación tienen también que estar enrejilladas, para evitar la entrada de insectos y pájaros. Como muchos productos alimenticios captan fácilmente olores y sabores de la atmósfera que entra en contacto con ellos durante el procesado, las áreas donde se manipulen alimentos, como la carne y productos que contengan pequeñas cantidades de grasa (derivados lácteos en polvo, harina y cacao), deben ser habitaciones bien ventiladas, que dispongan de aire limpio y humedad controlada.

Toda el área de procesado debe mantenerse a una presión ligeramente superior a la atmosférica. Así, sólo entrará aire tratado. El sistema de ventilación a presión positiva impide la entrada de insectos, polvo, etc. Es esencial alumbrar adecuadamente las zonas de procesado. El alumbrado afecta, tanto a la salud y seguridad de los operarios, como a la eficacia con que trabajan. Una iluminación adecuada pone en evidencia cualquier acúmulo de suciedad, así como el descuido y las condiciones de trabajo antihigiénicas. Al propiciar la limpieza y el trabajo cuidadoso, la iluminación influye sobre el estándar global de higiene de la fábrica.

Generalmente, se acepta que el diseño de los equipos de producción y la distribución de los mismos en la fábrica, basados en consideraciones de utilidad e higiene, evita fallos frecuentes en la elaboración de alimentos. Lo han reconocido así, tanto los procesadores de alimentos como los fabricantes de accesorios industriales para alimentos, las autoridades sanitarias, y cuantos intervienen en el establecimiento de las BPM de diseño higiénico y sanitario.

Las exigencias del diseño higiénico varían, en cierto grado, según la naturaleza de los alimentos que se procesen, pero los principios básicos son comunes al diseño de todo tipo de elementos a usar en la industria alimentaria. En general, el diseño, los materiales de construcción y los métodos de instalación de una planta en la que se elaboran o manipulan alimentos deben facilitar su limpieza y desinfección. Por ello, los aparatos deben ser fáciles de montar y desmontar con herramientas sencillas, o estar diseñados para su limpieza in situ. El interés por el diseño higiénico de las fábricas dedicadas a la elaboración y manipulación de alimentos parece haber nacido en la industria láctea de los Estados Unidos de América.

En el Reino Unido de Gran Bretaña, un grupo de trabajo, establecido en 1966 por el Comité Técnico Conjunto de la Federación de Fabricantes de Alimentos (FMF) y la Asociación de Fabricantes de Maquinaria para la Industria Alimentaria (FMA), estudió las recomendaciones del Comité de Estándares Sanitarios; del Comité de Estándares Sanitarios de la Industria Panificadora de los Estados Unidos y de la Asociación Nacional de Conserveros de los Estados Unidos, un resumen de las cuales se publicó en Food Processing, en octubre de 1964 y abril de 1965. Nacieron así los primeros siete **Principios del diseño sanitario** y, en 1967 publicaron una Guía de buenas prácticas, titulada **Diseño higiénico de una fábrica destinada a la elaboración o manipulación de alimentos**. Los mencionados principios son:

1. Todas las superficies que entren en contacto con un alimento deben ser inertes frente al mismo en las condiciones de uso y no deben migrar al alimento ni ser absorbidas por éste.
2. Todas las superficies que entren en contacto con los alimentos deben ser lisas y carecer de poros, de manera que no queden partículas de alimentos, bacterias o huevos de insectos atrapados en grietas superficiales microscópicas, de forma que sean difíciles de desprender y puedan convertirse así en fuentes potenciales de contaminación.
3. Todas las superficies que entren en contacto con los alimentos deben estar visibles para inspección; en caso contrario, el equipo debe ser fácilmente desmontable para su inspección; de no ser así, deberá demostrarse que los procedimientos de limpieza rutinaria eliminan la posibilidad de contaminación por bacterias o insectos.
4. Todas las superficies que entren en contacto con los alimentos deben ser de fácil acceso para la limpieza manual; si no fueran fácilmente accesibles, deben desmontarse con facilidad para su limpieza manual o, si se utilizan técnicas de limpieza in situ, deberá demostrarse que los resultados obtenidos sin desmontar las piezas son equivalentes a los que se obtienen limpiándolas manualmente, tras desmontarlas.
5. Todas las superficies interiores que entren en contacto con los alimentos deben estar dispuestas de forma que el equipo se vacíe y drene automáticamente.

6. El equipo debe estar diseñado de forma que proteja al contenido contra la contaminación externa.
7. Las superficies exteriores o que no entren en contacto con los alimentos deben disponerse de forma que no puedan alojar suciedad, bacterias o insectos ni encima del ellos ni en su interior, ni en los contactos que establezcan con otras piezas del equipo, los suelos, las paredes o los soportes.

Una versión ligeramente revisada de estos principios (que se han convertido en un código de prácticas bien establecido en el diseño del equipo para la industria alimentaria) recomienda que el equipo tenga un diseño interno que proporcione el menor número posible de hendiduras y espacios muertos en los que puedan quedar partículas retenidas. En ambas versiones de los principios, es evidente la preocupación por el importante papel que juega la naturaleza de las superficies del equipo. La naturaleza de estas superficies está relacionada con la de los materiales de construcción y los métodos de fabricación y uso. No deben usarse en la construcción de los equipos que puedan entrar en contacto con productos alimenticios sustancias tóxicas que puedan constituir un riesgo para la salud de quienes los consuman. Entre los metales que se encuadran ordinariamente en esta categoría figuran el cobre, el hierro, el cinc, el cadmio, el antimonio y el plomo. Algunas normas permiten la inclusión de plomo en los materiales de soldadura, en cantidades no superiores al 5%, aunque la soldadura autógena y las suturas cementadas han sustituido prácticamente por completo a las costuras soldadas.

El acero inoxidable es el material más usado para las superficies que entran en contacto con los alimentos y en la construcción de aparatos, tuberías, etc., en la industria alimentaria. Este material ofrece buena resistencia mecánica, es fácil de usar, resiste a la corrosión (aunque no se recomienda su contacto con salmueras), la abrasión y el choque térmico y es relativamente barato. Los grados preferidos son los tipos 304 y 3167 El tipo 316 es más caro, pero ofrece mayor resistencia a la corrosión. El acero inoxidable puede ser pulido mecánicamente o electropulido hasta lograr un excelente acabado que dé una superficie lisa, de fácil limpieza.

Los defectos de superficie que pueden encontrarse en las que entran en contacto con los alimentos pueden atrapar microorganismos que sobreviven en ellas al proceso de esterilización. Estos microorganismos pueden crecer y contaminar los alimentos; por esta razón se generó, hace tiempo, una demanda de superficies de acero inoxidable muy pulidas. El pulido mecánico para producir superficies finas es caro y produce muy diversos acabados. Una superficie muy pulida no se traduce necesariamente en un nivel de higiene más alto, puesto que los defectos superficiales no pueden eliminarse por completo y nunca se puede asegurar la continuidad total de la superficie. Sin embargo, para muchos fabricantes, una superficie de acero inoxidable pulida supone una superficie higiénica, de fácil limpieza, por lo que es automáticamente preferida.

La facilidad de limpieza se ve afectada por el grado de adhesión de la suciedad a las superficies y por el régimen de limpieza utilizado. La adhesión a la superficie es un fenómeno complejo en el que entran en juego numerosos factores que participan en la fijación de residuos, microorganismos, etc. La rugosidad de la superficie es uno de estos factores. Por esta razón, la bibliografía sobre la facilidad de limpieza de las superficies de acero inoxidable de distintos grados de acabado es contradictoria y está claro que un alto grado de pulido de la superficie no conduce necesariamente a facilitar su limpieza.

Los estándares 3 A2 para las superficies que entran en contacto con los alimentos especifican aceros inoxidables con un acabado de superficie de 150 granos, que hoy es el generalmente exigido. También se usan mucho el aluminio y sus aleaciones, pero este metal es atacado por los ácidos y los álcalis, por lo que deben seleccionarse adecuadamente los agentes de limpieza. Deben evitarse los metales disimilares capaces de promover acciones químicas o electrolíticas, porque, si entran en contacto con un ambiente líquido (por ejemplo, agentes de limpieza) pueden presentarse problemas de corrosión. El aluminio es proclive a este tipo de ataque. También se utilizan el metal **Monel** (una aleación de cobre y níquel), el cobre y el bronce adecuadamente estañados y, en las plantas de escasa capacidad que trabajan productos valiosos, el titanio. En algunos casos, las ventajas ofrecidas por el titanio (gran resistencia a la corrosión, resistencia mecánica y fácil limpieza) compensan su elevado costo.

Los materiales plásticos (PVC), ofrecen múltiples ventajas para la construcción de equipos para la industria alimentaria y su uso es cada vez más frecuente. Deben ser resistentes a la abrasión y estar exentos de compuestos que puedan migrar a los alimentos. Sus problemas de corrosión son despreciables y facilitan la inspección para comprobar la limpieza del sistema de conductos. Si la instalación y el manejo son correctos, el riesgo de rotura que conlleva el de contaminación del alimento es mínimo. La madera no es recomendable como material de construcción de las superficies que entren en contacto con los alimentos, debido a sus propiedades absorbentes y a las dificultades inherentes a su limpieza.

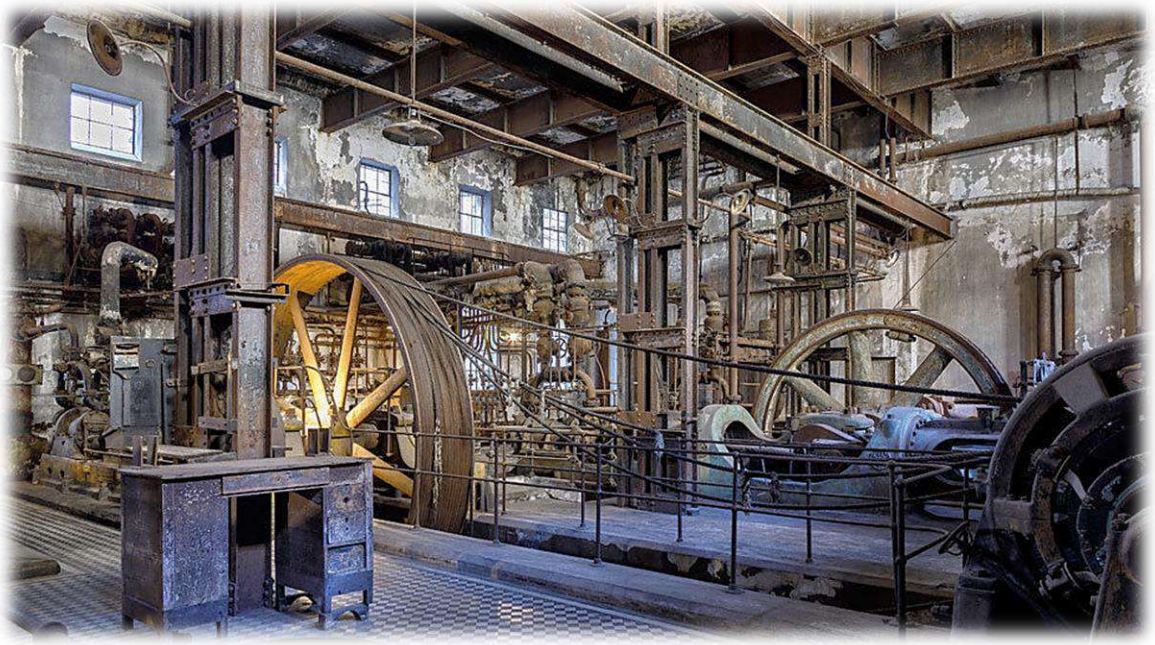
En la construcción de las distintas partes de una fábrica de alimentos hay que facilitar el flujo de los productos sobre las superficies de contacto interiores, evitando con ello, la acumulación indeseable de residuos que son una fuente potencial de contaminación, al quedar atrapadas en las áreas menos accesibles de la instalación. Se deben evitar las cavidades, las costuras, los tornillos, las rebabas interiores, etc., ya que promueven regiones estancadas que facilitan la deposición de suciedad. Las uniones permanentes de partes metálicas deben soldarse, preferentemente con las láminas paralelas, y la soldadura se debe desbastar con las superficies adyacentes, cuidando de evitar la formación de hoyos y grietas.

Todas las superficies que entren en contacto con los productos alimenticios deben estar construidas de forma que drenen por sí solas, evitándose, con ello, la acumulación indeseable del producto alimenticio. Para facilitar su vaciado completo, deben redondearse los fondos de los recipientes y, si son planos, deben estar inclinados. Se recomienda una pendiente mínima del fondo de 1 cm por metro. Si los fondos son redondeados, las líneas de descarga de los depósitos se deben colocar en el punto más bajo, para evitar bolsas estancas de líquido. Hay que evitar ángulos interiores agudos, siendo aconsejable que tengan un radio mínimo de 7 milímetros. Los mecanismos de cierre de los ejes (prensaestopas) y los cojinetes de las bombas y agitadores que muevan los productos líquidos o semilíquidos deben situarse fuera de la zona de contacto con el producto.

Los prensaestopas se deben poder desmontar fácilmente para facilitar la limpieza e inspección de los materiales de cierre y de las juntas. Todos los materiales de envasado tienen que ser inocuos, no porosos ni absorbentes e inertes frente a los productos alimenticios y a los de limpieza. Los equipos deben diseñarse de forma que se evite la contaminación de los productos con sustancias externas. Deben disponer de cubiertas o tapas de salida de la válvula de descarga para lograr un desagüe libre.

Las tapas deben diseñarse de forma que permitan el desagüe fácil de cualquier líquido que inadvertidamente entre en contacto con ellas, con una inclinación de la superficie que desplace el líquido de la zona de acceso. Los goznes de las tapas deben ser del tipo separable, para facilitar su limpieza. La ventilación adecuada y el diseño correcto de las vitrinas y sus conductos tiene, naturalmente, que contrarrestar los inconvenientes y el riesgo de contaminación que, en muchas fábricas, representa el goteo de los condensados de las escaldadoras al vapor, los autoclaves, los evaporadores y las calderas.

Nunca se insistirá demasiado en la importancia que tiene una estrecha vigilancia de la instalación para mantener un nivel higiénico satisfactorio, y siempre es recomendable un diseño que conduzca a un mayor nivel de limpieza. Esta es la razón por la que, incluso las superficies externas, que no entran en contacto con los productos, deben ser de fácil limpieza. Su contorno debe ser tal que evite la acumulación de cualquier tipo de depósitos que faciliten el crecimiento microbiano y el desarrollo de insectos en los aparatos y su entorno. Esto significa que las superficies exteriores deben estar exentas de costuras abiertas, grietas y otras protuberancias inasequibles. Las camisas de los equipos de transmisión de calor deben estar cerradas, para impedir la entrada de insectos.

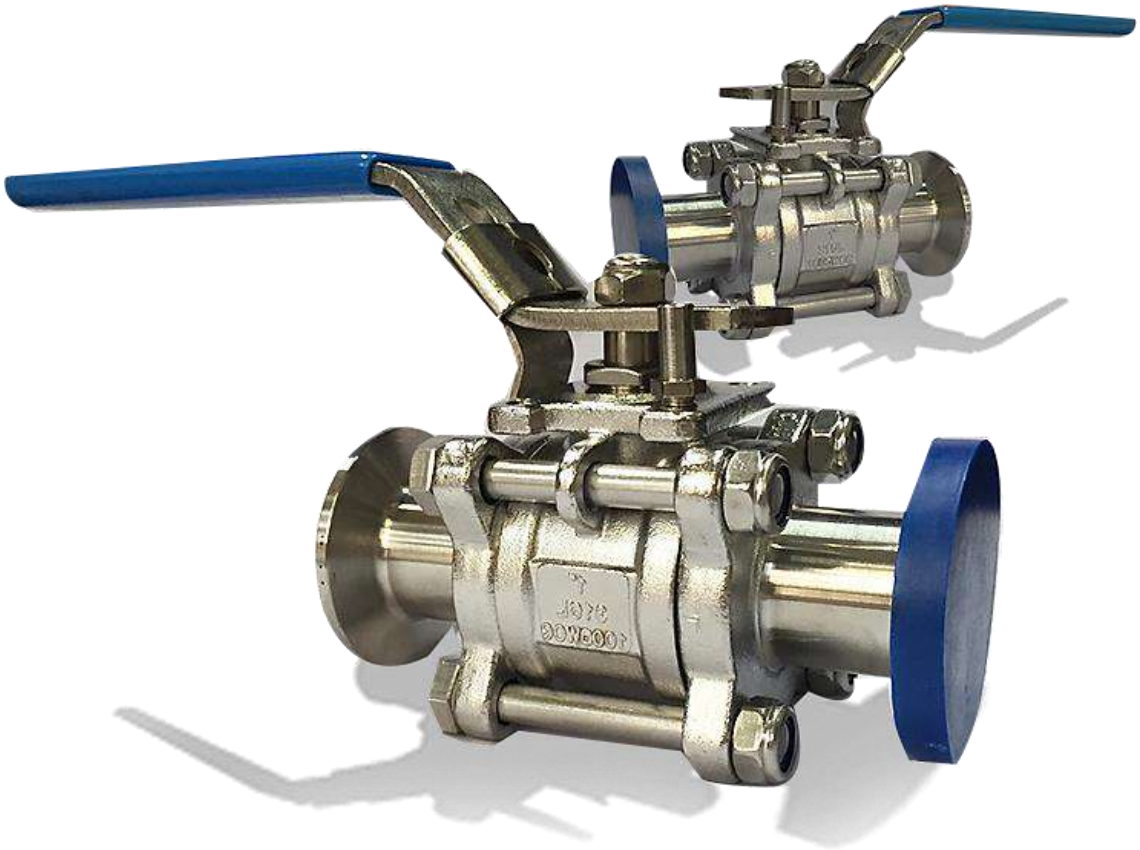


El diseño de las estructuras de acero y cemento de algunas fábricas antiguas, muestra la escasa atención prestada a los principios de diseño higiénico en el momento de su construcción. Las placas de asiento y los bancos en que se apoyan los equipos facilitan con frecuencia la multiplicación de insectos y bacterias. Los productos alimenticios pueden ser atrapados en huecos inaccesibles, en los que no es posible una limpieza satisfactoria. Los equipos, se deben montar sobre un piso o bancos de material no absorbente y de fácil limpieza. Se deben evitar los huecos entre la base de los mismos y el lugar en que se apoyan.

La distancia entre los equipamientos debe ser suficiente para permitir el acceso para su inspección y limpieza, pudiendo estar sellados al piso. La unión debe ser, sin embargo, impermeable al agua y contorneada para permitir un drenaje libre. Todas las tuberías y accesorios utilizados para el transporte de los productos alimenticios deben ser fácilmente desmontables para su inspección y limpieza o estar diseñados para la limpieza in situ (CIP). Suelen construirse con tubos de acero inoxidable austenítico, longitudinalmente soldados y las condiciones de la soldadura dependen de los métodos de fabricación y pulido usados. El acero inoxidable austenítico es un tipo específico de aleación de acero inoxidable. Los aceros inoxidables pueden clasificarse por su estructura cristalina en cuatro tipos principales: austenítico, ferrítico, martensítico y dúplex. Los aceros inoxidables austeníticos poseen austenita como su estructura cristalina primaria (cúbica centrada en la cara). Esta estructura cristalina de austenita se logra mediante adiciones suficientes de los elementos estabilizadores de austenita: níquel, manganeso y nitrógeno. Su estructura cristalina evita que los aceros austeníticos sean endurecibles por tratamiento térmico y los hace esencialmente no magnéticos.

Las uniones de las tuberías y los accesorios se efectúan por acoplamiento, pero los sucesivos tramos de tubería se pueden unir por soldadura. En los sistemas en que se unen por soldadura, la inspección de las superficies es difícil y es necesario elegir materiales compatibles, para evitar la corrosión de metales disimilares.

Las conexiones de cualquier tipo deben diseñarse de acuerdo con las normas higiénicas y las superficies de los acoplamientos deben ser de fácil limpieza y exentas de grietas en las que puedan acumularse restos de alimentos y crecimiento microbiano. Los materiales que constituyen las juntas deben ser apropiados para uso en la industria alimentaria y compatibles con los procedimientos normales de limpieza y esterilización. Las juntas deben estar apropiadamente localizadas y correctamente apretadas, para evitar rutas que faciliten la entrada a los microorganismos.



Tanto las tuberías, como las uniones, deben ser capaces de escurrir por simple acción de la gravedad; las tuberías deben descansar sobre soportes adecuados para prevenir desviaciones de las mismas, que puedan dar lugar a la retención de bolsas de producto alimenticio. También se deben evitar los «fondos de saco»; cuanto más cortos sean más fácil será la limpieza. Las bolsas que constituyen los fondos de saco deben reducirse al mínimo y la regla básica es la de que su longitud no sobrepase el diámetro de la tubería. El flujo que llega a una pieza en T debe dirigirse siempre hacia el fondo de saco. A fin de minimizar el riesgo de que las incrustaciones, la pintura o los condensados entren en contacto con los alimentos, las tuberías generales no deben pasar por encima de recipientes o líneas de proceso que contengan alimentos expuestos a la atmósfera. Las tuberías que conducen productos generales, como vapor de agua, agua o aire, a los depósitos de proceso deben pasar por detrás y no por encima de ellos.

Para facilitar la limpieza, las tuberías, los reactores, las consolas de los instrumentos, los tableros de control de la limpieza in situ, etc., no deben colocarse demasiado cerca de las paredes o los pisos. Hay que dejar espacio suficiente para la limpieza, tanto de los aparatos, como del suelo.

El objetivo final del diseño higiénico en la industria alimentaria, es reducir o eliminar el riesgo de que pueda existir una fuente de contaminación física, química o microbiológica para los alimentos, tanto de forma directa como indirecta. Además, el diseño higiénico persigue otras dos finalidades como son el facilitar la limpieza y desinfección y contribuir a la conservación y mantenimiento del propio equipo o instalación. Por lo tanto, el concepto de diseño higiénico combina factores de tipo mecánico, de tecnología y de higiene alimentaria. La susceptibilidad del alimento a la actividad microbiana determinará el equilibrio entre las exigencias técnicas y las higiénicas. Por ejemplo, en el caso de alimentos muy perecederos como la carne o el pescado las exigencias higiénicas de diseño de los equipos serán muy estrictas. Sin embargo, en el caso de productos secos, con baja actividad de agua que no contribuyen al crecimiento de microorganismos, los requisitos serán menos exigentes.

Un diseño higiénico correcto garantiza que la instalación o el equipo se pueden limpiar de forma adecuada y que sus superficies y componentes resisten el contacto con los productos alimentarios y los productos químicos que se utilizan para la limpieza. Los protocolos de limpieza y desinfección se contemplarán en el proceso de diseño de las instalaciones y equipos. Debe tenerse en cuenta que los equipos o instalaciones que sean difíciles de limpiar necesitarán procedimientos más intensos o productos químicos más agresivos o ciclos de limpieza y desinfección de más duración. Todo esto da lugar a un coste más elevado de las operaciones de limpieza y desinfección, y a una mayor duración de las mismas por lo que se reduce la disponibilidad de tiempo para producción, y se produce mayor deterioro de los equipos y por tanto menor vida útil, mayores consumos de agua, productos químicos y energía y mayores vertidos. Por tanto, un adecuado diseño higiénico puede tener una importante repercusión medioambiental.

Actualmente está cobrando fuerza el concepto de **limpiabilidad** que se define como la facilidad de una superficie, equipo o instalación para ser limpiada. Los métodos para evaluar la limpiabilidad consisten en someter el equipo a evaluar y otro de referencia al mismo proceso de ensuciamiento y de limpieza. La limpiabilidad del equipo se determina evaluando el crecimiento de los microorganismos después del proceso de limpieza al que se ha sometido al equipo. Los resultados que se obtienen en estos ensayos proporcionan a las industrias alimentarias y a los fabricantes de equipos, una información valiosa que puede demostrar que los equipos cumplen con los requisitos de seguridad alimentaria dispuestos en las normativas internacionales.

Hay un método acreditado por la FDA, el USDA y la ENAC, para la evaluación de la limpiabilidad de los equipos mediante limpiezas CIP o limpieza en el lugar o in situ. Por ejemplo en el caso de conducciones y tuberías, para facilitar su limpiabilidad deben cumplir entre otros los siguientes requisitos: las juntas de unión deben estar realizadas con material sanitario autorizado; las conducciones deben carecer de soldaduras y rugosidades internas; las tuberías, conducciones y válvulas deben tener una pendiente mínima del 1% para facilitar el escurrido y no presentar zonas muertas; las válvulas deben ser autovaciantes, para que no se produzcan acumulaciones de suciedad al interrumpirse el flujo; los cierres y juntas deberán resistir los cambios de temperatura a los que son sometidos.

Las superficies no deben presentar un riesgo toxicológico por lixiviación de componentes al alimento. Las superficies en contacto con el alimento deben ser resistentes a este, a los detergentes, desinfectantes y a todas las sustancias con las que tengan que entrar en contacto. Deben estar realizadas con materiales no absorbentes, algunas de las condiciones que deben cumplir son:

- Evitar escalones debidos a la falta de alineación de distintas superficies.
- En las juntas no deben existir fisuras en las que puedan quedar retenidos restos de suciedad.
- Debe evitarse el uso de juntas tóricas en contacto con el alimento e impedir el contacto del producto con uniones roscadas.
- Las esquinas deben tener, preferentemente, un radio igual o superior a 6 mm, el radio mínimo es de 3 mm. Se deben evitar las esquinas agudas, es decir, menores o iguales a 90º.
- Las superficies en contacto con el producto deben tener baja rugosidad, sin imperfecciones como picaduras, repliegues y fisuras. La rugosidad es el conjunto de irregularidades que posee una superficie, ***Ra*** representa la rugosidad media. Las superficies en contacto con alimentos deben tener una rugosidad media igual o inferior a 0,8 µm.
- Las soldaduras deben estar enrasadas, ser continuas y sin imperfecciones.

Las partes principales de los equipos deben ser fáciles de desmontar para que se pueda realizar su limpieza de forma relativamente rápida, seguida de su montaje. El acceso a todos los componentes debe ser libre y debe haber una buena separación entre el equipo y el suelo, de al menos 20 cm y un mínimo de 45 cm entre el equipo y las paredes. Todas las superficies en contacto con el alimento deben ser fácilmente accesibles además de para su limpieza y mantenimiento, para su inspección visual. Los elementos del equipo, para facilitar la limpieza, se deben poder desmontar fácilmente a mano o con herramientas sencillas, sistemas fáciles de soltar son por ejemplo los tornillos de paso de rosca ancha o abrazaderas.

Un ejemplo sería el desmontaje y tensado de una cinta transportadora sin herramientas, puesto que facilita su higienización, mantenimiento y sustitución de forma rápida, en ocasiones es suficiente con destensar la cinta para realizar su limpieza adecuada, en otros casos se instalan sistemas automáticos para la higienización de cintas. En el caso de los sistemas CIP, se debe demostrar que los resultados conseguidos son correctos sin desmontar, aunque en ocasiones, si es posible, es conveniente desmontar codos de las tuberías para realizar una inspección visual y comprobar la ausencia de suciedad o biofilms. También se utilizan en ocasiones microcámaras para la inspección del interior de tuberías.

El diseño de los equipos utilizados en el procesado de alimentos debe facilitar el drenado de los líquidos procedentes de los alimentos, de la condensación o de los productos de limpieza y desinfección, que en caso de acumularse podrían suponer un peligro químico. Los sistemas de drenaje evitarán salpicaduras, se podrán limpiar fácilmente y tendrán la inclinación adecuada para facilitar la salida de efluentes. Se deben evitar superficies horizontales, deben tener pendiente hacia un lado, de forma que el líquido fluya alejándose de la zona en contacto con el alimento. Las superficies diseñadas para evitar el estancamiento, son predominantemente convexas y redondeadas para propiciar la circulación de líquidos.

Es muy importante la integridad estructural de los materiales de construcción, de modo que las superficies no se alabeen o cambien de forma con las variaciones de temperatura y puedan causar el estancamiento de líquidos. Los desagües deben permitir la limpieza del suelo, facilitando la evacuación rápida de desechos líquidos. Los desagües y canalones deber estar equipados con rejillas y sumideros para retener los restos sólidos. Determinados equipos o elementos deben ser totalmente estancos para evitar la acumulación de suciedad, pero también para evitar otro tipo de problemas como son los contactos eléctricos o el mal funcionamiento de los equipos debido al mojado de piezas sensibles a la humedad.

En los equipos hay que proteger algunos mecanismos como por ejemplo el motor, que debe llevar una carcasa estanca y no oxidable. En general se recomienda el acero inoxidable como material de aislamiento. Las zonas huecas del equipo, como los bastidores, se deben evitar en la medida de lo posible o deben sellarse herméticamente, siempre es prefiere la estructura maciza al tubo hueco y la estructura monobloque a la combinación de piezas, laminados, etc. Los elementos como placas de montaje, soportes, cajas de conexión, tapones terminales y cualquier otra pieza deberán estar soldados a la superficie y no unirse mediante orificios taladrados o roscados.

El aislamiento térmico del equipo se debe realizar de tal forma que el material aislante no pueda ser mojado por entrada de agua desde el exterior. La entrada de agua también puede dar lugar a una pérdida de rendimiento del aislante. Las recomendaciones de clasificación internacional de protección que se deben satisfacer como mínimo al construir equipos para entornos sometidos a lavados intensos son las siguientes:

IP65	Conjuntos de transportador, dispositivos de clasificación y de separación, sensores y complementos opcionales	**IP65**: ausencia total de entrada de polvo. Protección frente a chorros de agua a baja presión. El agua proyectada por una boquilla sobre la carcasa desde cualquier dirección no tendrá ningún efecto nocivo.
IP66	Motores de accionamiento	**IP66**: ausencia total de entrada de polvo. Protección frente a chorros de agua potentes. El agua proyectada en chorros potentes sobre la carcasa desde cualquier dirección no tendrá ningún efecto nocivo.
IP69k	Células de pesaje, cajas y armarios de control que contengan componentes electrónicos sensibles, por ejemplo, PC industrial PC (IPC)	**IP69k**: la especificación DIN 40050-9 estándar para aplicaciones de lavado a alta presión y alta temperatura. Estas carcasas deben poder resistir la limpieza a alta presión y con vapor.

Las instalaciones eléctricas e iluminación deben ser estancos para evitar el anidamiento de roedores e insectos o la acumulación de suciedad. Debe garantizarse la estanqueidad de todos los aparatos eléctricos en las zonas de manipulación de alimentos en las que se llevan a cabo operaciones de limpieza y desinfección. Los sistemas de iluminación también deben estar protegidos por compartimentos estancos, de forma que en caso de rotura no puedan caer sobre los alimentos y suponer un peligro físico. Además, su diseño debe permitir la limpieza fácil y evitar la acumulación de polvo.

Los materiales de construcción en la industria alimentaria deben ser resistentes a la corrosión, no tóxicos, mecánicamente estables, de fácil limpieza y no deben contribuir a la proliferación de microorganismos. Además, deben ser completamente compatibles con el producto, el entorno, y los productos y los métodos de limpieza y desinfección. Su acabado superficial no debe verse afectado por las condiciones del uso al que se destinan.

En general, el acero inoxidable ofrece una gran resistencia a la corrosión, por ese motivo se usa mucho en la industria alimentaria. La gama de aceros inoxidables disponibles es grande y la selección de la calidad más apropiada depende de las propiedades corrosivas (no sólo por lo que respecta a los iones químicos involucrados, sino también al pH y la temperatura) del proceso y de los productos de limpieza y desinfección. La elección también estará determinada por otros factores como las tensiones a las que esté sometido el acero y a su soldabilidad, dureza, coste, etc. Los aceros utilizados en la industria alimentaria son el AISI-304L (para procesos en que se ve sometido a bajos niveles de cloruro, bajas temperaturas y pH no ácido) y el AISI-316L, que se utiliza más comúnmente por su mayor resistencia a la corrosión. Si las temperaturas se acercan a 150º C, incluso los aceros AISI-316 pueden sufrir corrosión y puede que sea necesario el uso de aceros AISI-410, AISI-409, AISI-329.

El aluminio es un metal muy ligero y muy buen conductor eléctrico y térmico, presenta, una excelente resistencia a la corrosión ya que reacciona con el oxígeno para formar una capa muy delgada de óxido de aluminio, que le protege de los medios corrosivos. Pero tiene una baja dureza, pequeña resistencia al desgaste y su utilización a alta temperatura es muy limitada. Por este motivo únicamente se utiliza para la fabricación de algunos utensilios. Los polímeros presentan propiedades que los hacen aptos para su uso en industria alimentaria, como son; baja densidad, amplio rango de utilización, su coste e incluso cierta resistencia a la corrosión. Sus propiedades varían mucho, en función de la materia prima utilizada, los aditivos incorporados y el procedimiento de fabricación. Al igual que el resto de materiales utilizados en la industria alimentaria deben ser inocuos y se deben seleccionar en función de las condiciones del uso al que se destinan.

Los polímeros termoplásticos utilizados en alimentación suelen ser resistentes a los ácidos, álcalis y productos de limpieza y desinfección, soportan grandes variaciones de temperatura y suelen emplearse en la construcción de tuberías, accesorios y cintas transportadoras. Los termoestables suelen pertenecer a las familias de los poliésteres, los poliuretanos y las resinas epoxídicas. El intervalo de temperaturas de uso es más amplio que para los termoplásticos, pero son más sensibles a ácidos y álcalis. Los elastómeros o cauchos suelen emplearse para cierres, juntas, tuberías y cintas transportadoras. El más utilizado es el caucho natural, pero también se emplean otros sintéticos como el neopreno. En algunos casos son materiales que han sido ampliamente utilizados, pero bien la experiencia o los nuevos requerimientos han hecho que se desaconseje su uso en industria alimentaria, un ejemplo es el acero galvanizado que se deteriora con gran facilidad.

Debe evitarse el uso del plomo en soldaduras y el del cadmio y antimonio en la construcción de equipos en contacto con los alimentos. Tampoco se debe utilizar la madera y otros materiales absorbentes. El uso de componentes pintados en zonas de producción de alimentos está totalmente desaconsejado, puesto que los revestimientos acaban por estropearse y podrían contaminar el producto.

Las **Buenas Prácticas de Manufactura**, o por sus siglas (BPM) es uno de los programas más complejos que existe en la industria de alimentos, bebidas y farmacéutica, donde cumplir con los requisitos básicos que establece la regulación local puede ser un desafío para este tipo de operaciones. Desafortunadamente, vemos con una alta frecuencia, particularmente en la industria de alimentos una interpretación limitada sobre cumplir con las BPM y se piensa que es apenas llevar una correcta práctica operativa y sobre todo una higiene personal.

Esto vas mucho más allá y por eso las BPM se convierten en el gran desafío, a pesar de contar con certificaciones internacionales aprobadas. En particular la industria de alimentos presenta aún grandes oportunidades de desarrollo de una apropiada estrategia para dar cumplimiento a uno de los programas básicos que se encuentran en el grupo de las BPM. La construcción del establecimiento y los equipos, llamado **diseño sanitario**, tampoco deja de ser un universo bastante amplio este programa, sin embargo, quiero referir directamente las condiciones de los pisos, dándolo como corolario de ejemplo en el final de ´peste subtema.

Siendo este uno de los mayores desafíos para el área de ingeniería y mantenimiento, debido a que puede convertirse en la decisión más difícil de tomar a la hora ejecutar el proyecto. Es importante entender desde esta área la expectativa del área de inocuidad de los alimentos sobre las condiciones que deben tener los **pisos** para tipos de industrias como, cervecería, láctea, conservas, cárnica o pescado, donde las características ambientales pueden llegar a ser extremas, como lo son las altas y muy bajas temperaturas, alto adicionado de químicos de limpieza, carga pesada, vibraciones y alta humedad, hacen que esto sea la mejor prueba de fuego para salir airoso al final de proyecto y sobre todo meses después de haberlo terminado. Un presupuesto adecuado para un buen piso y correctamente gestionado eliminará 20 años de no conformidades y correcciones paliativas sobre pisos. Se deben considerar cuatro parámetros para decidir sobre un piso:

Higiénico: ¿es lavable, no ofrece una porosidad para promover el crecimiento de microorganismos formadores de biocapas?
Seguro: ¿es un piso que cumple con los requisitos mínimos de Coeficiente Dinámico de Fricción (DCOF)? ¿Seguridad Industrial le ha indicado que el piso debe ser rugoso?, sin embargo, ¿qué significa rugoso?
Legislación: el material ofrecido por el proveedor, ¿es aprobado por alguna legislación reconocida internacionalmente?
Proceso: ¿cárnico, pescado, cervecería, lácteos, conservas acidificadas, alta humedad y temperaturas extremas?

Se pueden optar por 3 soluciones a priori:

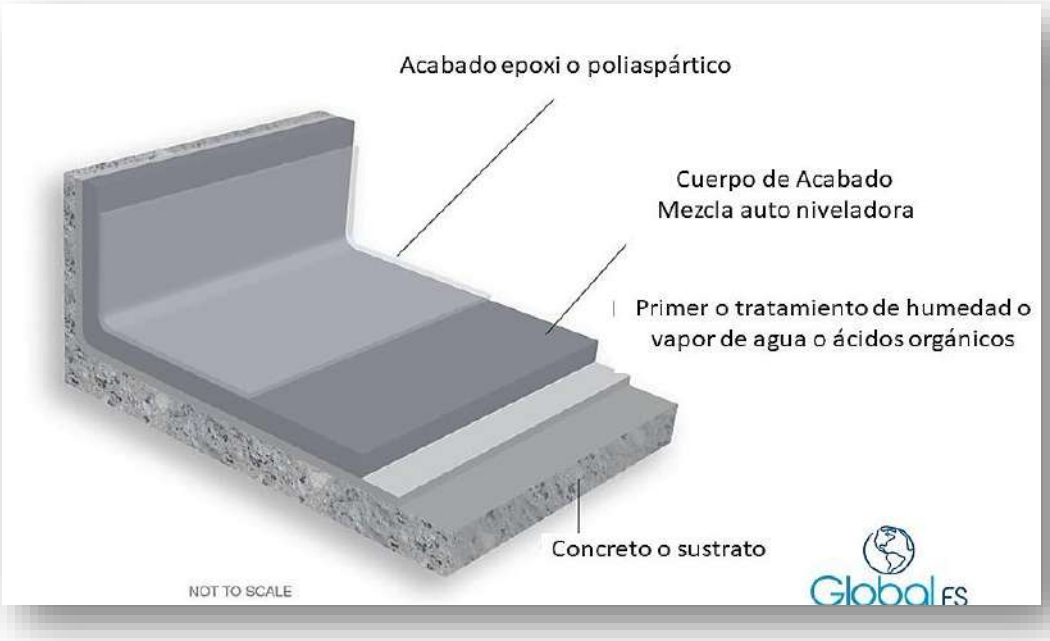
- **Solución 1:** Materiales para pisos de resina
- **Solución 2:** Azulejos de ladrillo o losetas
- **Solución 3:** Cemento aditivado

Las soluciones 2 y 3 son las más simples de tomar la decisión, sin embargo, debe conocer las ventajas y desventajas de cada una. Ciertamente son más ventajas las ofrecidas, sobre todo los azulejos de ladrillo, que son altamente recomendados en la industria que ofrece procesos agresivos como ácidos y alcalinos. No olvidar, que todo piso de azulejos necesita un mantenimiento anual. La solución 1, no quiere decir que sea la más compleja, sino que es la más vulnerable al fraude. Esto se da, muchas veces, a raíz de proveedores que tienen buenos conocimientos sobre instalación de pisos, sin embargo, los mismos, por desconocimiento de quien los contrata, ejercen el fraude de manera deliberada, por deshonestidad y por el afán de simplemente vender el piso.

En pisos de resina, nos vamos a encontrar variedades, donde los más recomendados son:

1. **Sistema epóxico**
2. **Sistema uretano**
3. **Sistema Metil Metacrilato**
4. **Sistema de Descarga Electrostática**

La opción 4, es un piso usado para la industria de electrónicos, automotriz y farmacéutica, entre otros. La opción 3, es una estupenda alternativa, ofrece alta resistencia a ataques químicos, anti resbalante, temperaturas extremas como cámaras de conservación por debajo de -32°C y alta resistencia al agua. Sin embargo, su desventaja circula entorno a su valor. Solamente debe asegurarse que la instalación respete la humedad relativa del ambiente y medir si hay residuos contaminantes de cloruro de calcio en el sustrato para evitar una contaminación de la losa. Nos quedan las opciones 1 y 2, las comúnmente usadas en la industria de alimentos. Ambas, son también estupendas alternativas, pero debe tener cuidado sobre las condiciones de su proceso y que su instalación se la correcta en las capas necesarias y su espesor.



Capas necesarias para un correcto diseño de piso aditivado

- El espesor del acabado debe ser mayor que 1,9 mm (5/64 pulgadas)
- El tiempo de mezcla y velocidad es fundamental
- Asegurar la calidad de la resina
- Evitar incompatibilidades de materiales (no usar la cobertura para fijar metales como un drenaje)
- Asegurar que su proveedor agregó las dos capas de praimer o primer
- Asegurar la calidad del sustrato
- Asegurar descontaminar el sustrato con limpieza seca y/o escarificado

Hay dos eventos externos que afectan significativamente el desempeño de un sistema de gestión y la marca en una fábrica de alimentos, comencemos por el más simple, el resultado negativo de una auditoría externa o inspección regulatoria y en segundo lugar aún más complejo, el retiro de producto del mercado debido a una contaminación en el producto. Parezca increíble o no, los pequeños detalles marcan grandes diferencias en los resultados. Por eso, las Buenas Prácticas de Manufactura, en específico el diseño sanitario de equipos es crucial en estos eventos, ya sea que el equipo entre en contacto directo con los alimentos o no.

Los encargados de establecimientos de alimentos, junto con su Gerente de planta y el equipo HACCP deben tomar precauciones adicionales cuando se trata de equipos de procesamiento en alimentos vulnerables al desarrollo de microorganismos patógenos, sobre todo en sistemas de transporte, tolvas, carros, con diseños complejos donde el producto está en contacto directo o sistemas como balanzas o partes mecánicas bajas donde el producto no entra en contacto directo con la superficie.

El diseño higiénico del equipo es clave para el éxito. Ayuda a salvaguardar la inocuidad de los productos fabricados y a pesar de que existen buenos recursos en el mercado como el del Instituto Norteamericano de la Carne que a través del grupo llamado **"Fuerza de tarea para la mitigación de *Listeria monocytogenes*"** quienes han desarrollado los diez principios para el apropiado diseño sanitario sigue habiendo grandes desafíos en la industria alimentaria sobre el entendimiento del marco de prioridades para un correcto diseño sanitario en equipos que entran en contacto con alimentos. Estos diez principios han sido apoyados por agencias reguladoras como FDA, USDA y EFSA donde todas coinciden en cinco factores claves a tener en cuenta para construir y mantener equipos que procesan alimentos, a saber:

1. **Uso de materiales compatibles**

Las partes del equipo que estén en contacto directo con el producto deben ser neutras en todas las condiciones de funcionamiento, así como tampoco reaccionar a los agentes surfactantes de limpieza utilizados en estas superficies, siempre que no exista un abuso de uso en la concentración durante su aplicación. No vale la pena adquirir un material costoso como un rodamiento para luego adicionar excesiva concentración del agente (alcalino clorado), que finalmente debilitará el material. Otros requisitos incluyen, los materiales no corrosivos como las empacaduras o sellos y su la estabilidad mecánica. Por ejemplo, existen varios materiales no recomendados para contacto con alimentos, tales como, acero al carbono, hierro fundido, hierro negro, acero galvanizado, cobre, latón, bronce, aluminio, otros componentes de aleaciones tóxicas.

2. **Propiedades de la superficie**

En general, existen estándares establecidos para la rugosidad máxima permitida para las superficies que entran en contacto directo con el producto. Cuanto más rugosa es la superficie, más difícil es limpiarla. Esto eventualmente aumenta las posibilidades de crecimiento microbiano debido a su fase de atraque durante la formación de biocapas. Además, las superficies porosas normalmente no se aceptan en los equipos de procesamiento de alimentos. La rugosidad de la superficie interior depende de la industria. El requisito típico en la industria que procesa alimentos sensibles al desarrollo de patógenos es de un Ra < 0.8 µm. De acuerdo con las normas internacionales, existe una diferencia entre especificar un "máximo valor" y un "valor superior" (y de manera similar para un "valor mínimo" y un "valor inferior"). Si por ej. se especifica un "valor Ra superior" de 0.8, lo que significa que el 16 por ciento de las mediciones pueden ser superiores a este valor.

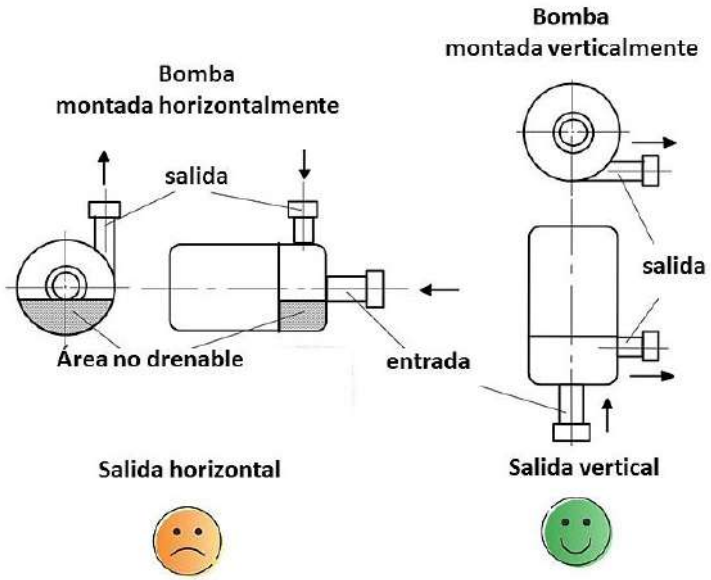
3. **Limpieza microbiológicamente aceptable**

Este principio recomienda que el fabricante del equipo trabaje con el procesador interesado durante la etapa de diseño del equipo, donde se recomienda altamente la participación de las áreas de ingeniería, mantenimiento, sanidad y calidad, de modo que antes y durante el proyecto, el fabricante de equipos tenga una buena visión de cómo se puede fácilmente desarmar, limpiar, armar y desinfectar el equipo, sin embargo, los procesadores de alimentos utilizan sistemas de limpieza y desinfección todos los días y pueden proporcionar información útil sobre la mejor manera de limpiar y desinfectar el equipo en un determinado momento.

Es una operación de fabricación de equipo poco común que tendría la capacidad de lavar un equipo, y mucho menos desinfectarlo. Los fabricantes de equipos no son expertos en procedimientos de limpieza; sus instalaciones de fabricación se asemejan a talleres mecánicos repletos de tornos y equipos de moldeado de metales.

4. Auto drenado apropiado

El auto drenado facilita la eliminación de productos químicos y del propio alimento del equipo de proceso. La superficie y tuberías del equipo están diseñados para inclinarse hacia los puntos de drenaje. Deben estar libres de crestas u obstrucciones que obstaculicen el flujo de residuos. El fabricante debe considerar sistemas apropiados para el drenaje adecuado de los agentes de limpieza. Incluso si solo se usa agua para la limpieza, se debe tener cuidado de drenarla por completo, ya que el agua estancada o residual genera microorganismos dañinos que pueden multiplicarse rápidamente o residuos de alérgenos. Veamos en la siguiente imagen lo inaceptable y aceptable de un auto drenado.



5. Soldadura higiénica

Las soldaduras continuas representan el desafío más común en la industria de alimentos y bebidas, no se trata de soldar con un electrodo común a base de zinc e intentar aplicar un desbaste para simular un correcto acabado sanitario.

La soldadura higiénica necesita de experiencia, así como la correcta selección del calibre de la lámina de acero inoxidable y tiempo suficiente para completar todos los pasos y dar este acabado final. Utilizar tungsteno para acero inoxidable, es fundamental y la clave del éxito será la correcta técnica de aislamiento de la zona de soldado para evitar una contaminación durante la operación de soldado. Una vez completado, utilizar la serie de discos de desbaste y pulido es importante para dar el resultado esperado. Comúnmente los discos de desbaste son de grano 40, grano 80, grano 120 y también la aplicación de un gel decapante formulado con ácido nítrico y fluorhídrico, sin contenido de cloruros ya que es el principal enemigo del acero inoxidable, este gel reaccionará en frío con la superficie del material para la eliminación de impurezas y la soldadura quedará apta para entrar en contacto con alimentos. No aplicar estos pasos, puede conllevar a una incorrecta soldadura.

"Mientras más largo sea el drenaje en tu fábrica, más dolores de cabeza tendrás". Sin importar el continente, la región, el país y la cultura local, el comportamiento microbiano es igual, esté donde uno esté. No es un caso diferente al de *Listeria monocitogenes y Salmonela*, donde una planta que produce alimentos "Listos para comer" puede verse en serias dificultades cuando las superficies, como son zona 2 o zona 3 (donde incluyo a los famosos drenajes largos) enfrentan el desafío de un desarrollo de patógenos ambientales confirmados debido a la dificultad en el diseño sanitario por el difícil acceso y falta de una herramienta apropiada para este tipo de punto de acceso. La decisión de instalar drenajes no está únicamente relacionada con el caudal de agua servida que proviene del proceso y la limpieza, sino que también importa aún más es el nivel de riesgo que pueda presentarse en la fábrica, favoreciendo al desarrollo de *Listeria* y la formación de biocapas en este tipo de superficies, pudiendo esparcirse más rápido de lo esperado, aprovechando la facilidad que le dan estos drenajes atrincherados. Por último, deben pensarse y hacer muchas veces la evaluación de riesgos de inocuidad antes de cometer el pecado capital más común en la industria de alimentos, cual es el de la selección e instalación de drenajes.

Figura 1. Montaje de tubería en circuito CIP con diseño inadecuado en sentido negativo. EHEDG

8. Limpieza y desinfección de las plantas de alimentos

Si la fábrica y su equipamiento integral, se han diseñado teniendo presentes los principios modernos de higiene (BPH), se habrá dado un paso esencial para que la fábrica opere en condiciones higiénicas. Sin embargo, un nivel aceptable de higiene sólo se logrará si los procedimientos de limpieza y desinfección usados son correctos. Las operaciones de limpieza y desinfección son esenciales en una fábrica de elaboración de productos alimenticios, si se quieren producir alimentos en condiciones de seguridad e higiene. Estas operaciones se pueden llevar a cabo en las corrientes de materias primas y productos, en algunos procesos (como en los de preparación de conservas de frutas y hortalizas), pero han de aplicarse ineludiblemente a la fábrica y a los aparatos de todas las fábricas de alimentos. Las operaciones de limpieza y desinfección de la fábrica y sus equipamientos, no deben ser consideradas opcionales por los operarios. Son una parte integral del funcionamiento de la fábrica, que requieren una tecnología propia. Las operaciones de limpieza han de estar coordinadas con las realmente implicadas en el procesado de los alimentos. Para conseguir una limpieza eficaz de la fábrica, especialmente en el caso de que se recurra a la limpieza in situ (GIP), es necesario desarrollar un programa de operaciones satisfactorio, lo que, a su vez, obliga a un estudio detallado, que debe revelar los cuellos de botella y las áreas en las que es posible ahorrar tiempo, agua y productos químicos. Los aparatos usados en la industria alimentaria se deben limpiar y desinfectar inmediatamente después de su utilización y, si permanecen parados, salvo durante períodos muy breves, hay que desinfectarlos de nuevo antes de volver a utilizarlos. **Limpieza y desinfección** son dos operaciones diferentes, aunque, naturalmente, es más fácil alcanzar una desinfección satisfactoria si se lleva a cabo sobre una superficie limpia, puesto que la suciedad puede proteger a los microorganismos contra los agentes desinfectantes. Durante la **limpieza**, los productos alimenticios residuales de la instalación y los depósitos sólidos producidos durante el proceso se desprenden físicamente con cepillos, por la acción de fluidos en flujos muy turbulentos o combinando ambos métodos. El desprendimiento se facilita añadiendo detergentes y acondicionadores que ayudan a humectar la superficie de los depósitos y su subsiguiente separación de las superficies. La limpieza con detergentes debe ir seguida de un enjuagado con agua limpia. Se ha de cuidar que la suciedad desprendida no se deposite en otras partes de la instalación. La limpieza con detergentes es más eficaz si va precedida de un lavado con agua clara, que arrastra la mayor parte de la suciedad. Al eliminar la suciedad, se eliminan también gran número de microorganismos contaminantes. Pese a ello, terminada la limpieza, siempre quedarán en las superficies microorganismos que hay que destruir, si se quiere evitar el riesgo de contaminación.

Las superficies de contacto requerirán la desinfección con vapor de agua, agua hirviendo o un desinfectante químico. El desarrollo de detergentes-esterilizantes en los últimos años ha hecho posible, en ciertos casos, combinar en una sola operación la limpieza y la desinfección. Operar así tiene la ventaja de reducir tiempos muertos. Sin embargo, algunos desinfectantes químicos son menos eficaces cuando se combinan con detergentes. Esta pérdida de eficacia se puede superar aumentando la concentración del esterilizante, pero los costos de limpieza crecen con ello.

Existe cierta ambigüedad en la nomenclatura relacionada con la limpieza y desinfección de las fábricas de alimentos. Con el término limpieza se hace referencia a los procesos que eliminan la suciedad presente en una superficie, pero no a los que destruyen las formas vivas de las superficies que han de contactar con los alimentos. El término esterilización se refiere a cualquier proceso que destruye los organismos vivos y, por lo tanto, una superficie estéril es aquella que está totalmente exenta de microorganismos. Estas condiciones se consiguen en el «llenado aséptico», pero no en la limpieza general de una instalación. Los términos «esterilidad comercial» y «cuasi-esterilidad», se utilizan para describir aquellas condiciones en las que un número aceptablemente pequeño de microorganismos ha sobrevivido al tratamiento esterilizante. Los métodos normales de higienización de fábricas de la industria alimentaria incluyen:

- Limpieza con agua y un detergente adecuado al tipo de suciedad, a la dureza del agua, a los materiales de construcción de los aparatos y a la técnica de limpieza que se utilice.
- Desinfección por calor, usando como medio esterilizante vapor de agua, agua hirviendo, o un agente químico.

La operación de limpieza se puede llevar a cabo de dos formas distintas y las fábricas modernas de elaboración de alimentos se diseñan de forma que puedan limpiarse:

- previo desmantelamiento o
- in situ (CIP).

El primero, o desmantelamiento del equipo, es el método de limpieza más antiguo; todavía se utiliza mucho y es muy eficaz si se lleva a cabo correctamente, pero requiere que la instalación se construya de forma que permita desmontarla fácilmente. Una vez desmontada, las superficies de los componentes se limpian con cepillos y disoluciones de detergente. El detergente residual se elimina con agua limpia. Se elige el detergente que permita arrastrar, en disolución o suspensión, los productos alimenticios y la capa de suciedad desprendida. Este método de limpieza facilita la inspección visual de las superficies de contacto, a fin de comprobar que la limpieza ha sido buena.

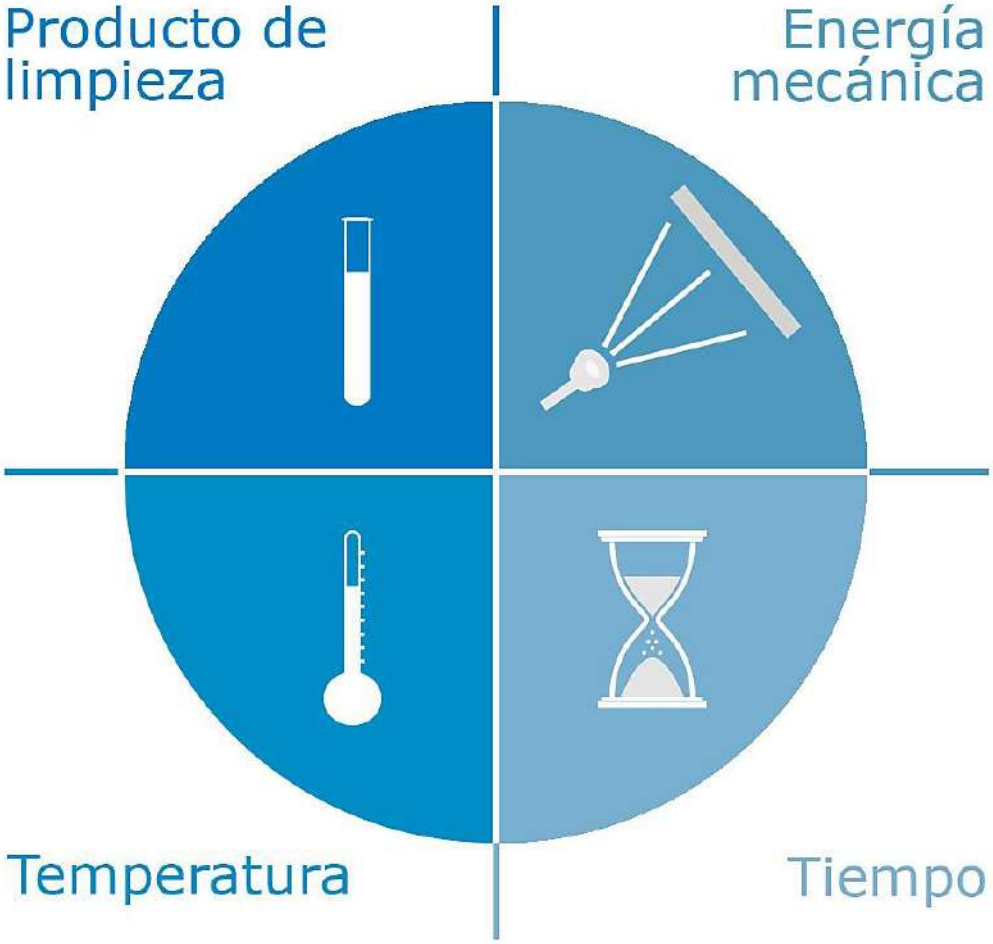
Son muchos los medios de limpieza disponibles. Se requieren escobas, cubos, fregonas, raspadores, bayetas y esponjas. También son muy útiles los cepillos, manuales y mecánicos. Los chorros de aire comprimido son insustituibles para eliminar el polvo de las superficies de los aparatos. Las aspiradoras a vacío son también de gran utilidad en la eliminación de sólidos. Los chorros de agua, tanto a baja como a elevada presión, son útiles si se emplean con discreción, ya que pueden esparcir la suciedad sobre áreas muy grandes. Las pistolas bifásicas de limpieza se utilizan extensamente en la limpieza de las fábricas en que se manipulan y elaboran alimentos. Entre ellas, se encuentran las de chorro de agua-vapor de agua y las de vapor de agua-detergente.

Las pistolas de vapor de agua se emplean también para la higienización de las superficies de la factoría, no debiéndose utilizar en las proximidades de las piezas que forman parte de los sistemas de transporte, engranajes, raíles, poleas, etc., ya que arrastran fácilmente el lubricante de las superficies de fricción. Para la limpieza de piezas pequeñas son muy convenientes los tanques de inmersión, con disoluciones de detergentes. Después de un lavado previo con una corriente de agua, las piezas se dejan a remojo en el tanque, antes de cepillarlas in situ. Un lavado final con agua caliente a unos 82°C asegurará el secado natural.

Para piezas mayores, como tanques de almacenamiento, se prefiere la aspersión a la limpieza manual. La limpieza interna manual puede ser difícil, mientras que las aspersoras correctamente diseñadas permiten limpiar por completo superficies relativamente inasequibles. Se dispone de tipos muy diversos de cabezas aspersoras. Pueden ser fijas o no. Se prefieren las instalaciones permanentes. Las cabezas se deben diseñar de conformidad con las normas higiénicas y deben ser autolimpiables y autoescurribles. Tiene que asegurar la imposibilidad de que el agente de limpieza escape y llegue al producto alimenticio durante el procesado. La incorporación de dispositivos permanentes de limpieza en los grandes aparatos de procesado supone un paso importante hacia la limpieza in situ. Las espumas y los geles se emplean cada vez más en la limpieza de áreas extensas: paredes, superficies de trabajo, etc. En la limpieza con espuma, se añade un agente espumante a la disolución de detergente, lo que permite obtener una espuma más

espesa y duradera, que se adhiere a la superficie que se desea limpiar, aumentando de este modo el contacto entre la suciedad que se pretende retirar y el detergente. Existen equipos de limpieza por espuma a presión. La limpieza con espumas permite apreciar con claridad el área que realmente entra en contacto con el agente de limpieza. En la limpieza con geles, se añade al detergente una sustancia gelificante, obteniéndose una mezcla que se pega a las superficies inclinadas y verticales, prolongando así los tiempos de contacto, para conseguir un buen ablandamiento de la suciedad. Ambos tipos de limpieza necesitan un aclarado con chorros de agua, por lo que el agente de limpieza tiene que ser fácilmente arrastrable por el agua.

Las instalaciones de manipulación y elaboración de alimentos requieren una limpieza frecuente. Desmontarlas para ello, supone largos tiempos muertos y mucha mano de obra. El montaje y desmontaje repetido puede ocasionar, además, averías mecánicas y exige mayores gastos de mantenimiento. La limpieza manual de las superficies interiores de los tanques de gran capacidad, es ardua y aún los operarios más conscientes y meticulosos pueden dejar pequeñas bolsas de suciedad que conducen a la alteración o deterioro del producto. Para evitar los inconvenientes inherentes al desmantelamiento, se ha desarrollado la limpieza in situ en el lugar (CIP).



Las técnicas de limpieza in situ permiten alcanzar altos estándares higiénicos, equivalentes a los logrados mediante el desmantelamiento y limpieza manual de las tuberías. Permiten controlar mejor el uso de productos químicos peligrosos (ganando, por tanto, seguridad) y un uso más económico de los mismos. Como en la limpieza tras el desmantelamiento, después un lavado inicial con agua, se recurre a disoluciones de detergentes para arrancar los residuos de alimentos y las películas formadas en las superficies interiores del sistema. Las tuberías se limpian por medio de un flujo turbulento de la disolución apropiada. Las piezas grandes «en línea», cuyo llenado resultaría caro, están equipadas con cabezas aspersoras, fijas o rotatorias, diseñadas de modo que la aspersión alcance a toda la superficie interna.

Se recomienda un enjuagado inicial con agua, porque permite reducir la cantidad de detergente a usar para eliminar la suciedad residual. Tras un enjuagado final, para arrastrar el detergente, se desinfectan las superficies limpias con los productos químicos adecuados. El sistema de limpieza depende de la complejidad de la fábrica. En esencia, lo que se hace es preparar la disolución en un depósito de almacenamiento, desde donde se impulsa a través del sistema. En condiciones normales de operación, este depósito y las conducciones a través de las que se impulsan las disoluciones de limpieza deben estar aislados, para evitar la fuga de las disoluciones de productos químicos y su contacto con las corrientes del alimento. Esto se consigue incorporando «piezas clave» removibles, que completen una línea de flujo, pero no las dos, o separando ambos sistemas por medio de dos válvulas de aislamiento separadas por un tubo de drenaje, abierto cuando el sistema de producción está en funcionamiento.

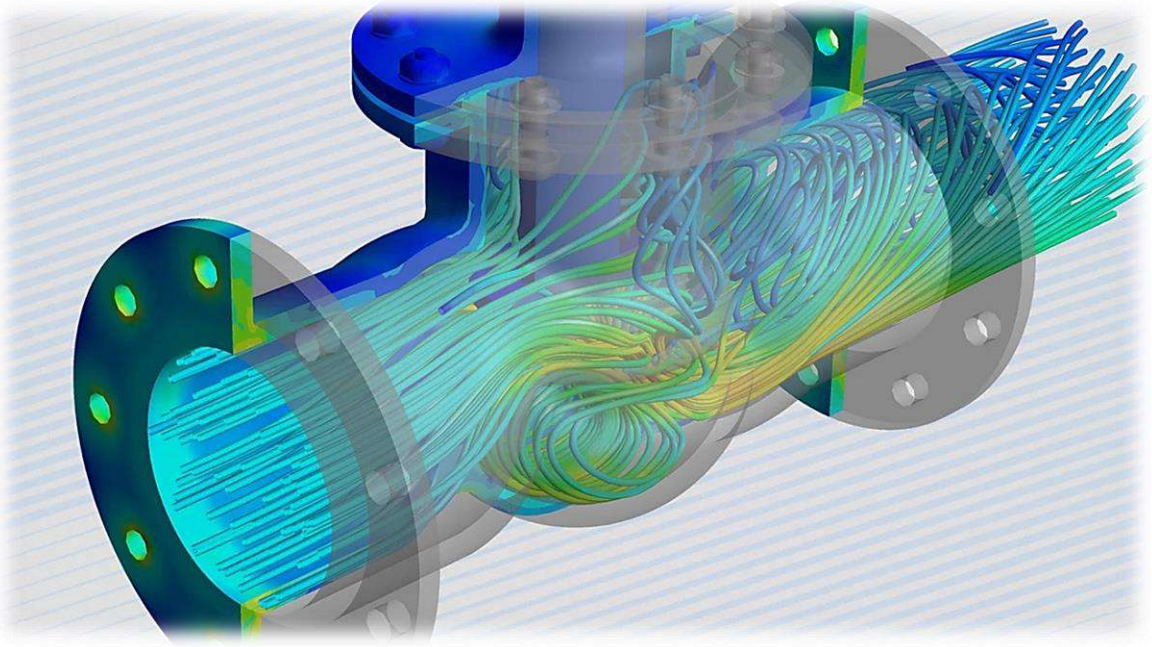
Tan pronto como se pueda, al término del funcionamiento del sistema de producción, se aíslan totalmente los tanques de almacenamiento de materia prima y producto acabado, se drena el sistema y se limpia, haciendo circular agua fría, para arrastrar gran parte de la suciedad. Luego, se pasan a través del sistema, sucesivamente, un detergente apropiado, agua, un desinfectante y de nuevo agua fría. Según el grado de suciedad de las superficies, las disoluciones utilizadas se drenan a los sistemas de desagüe o se recogen en tanques de recuperación para su uso posterior. Se han desarrollado así sistemas **«de un solo uso»** (para detergentes de corta actividad, que se descartan una vez utilizados, y para circuitos muy sucios); sistemas de **«reutilización»** (constituidos por tanques de detergentes cáusticos y ácidos y provistos de equipos para el calentamiento, que permiten cambiar la temperatura del agua y de las disoluciones de los detergentes y desinfectantes empleados) y sistemas de **«uso múltiple»** (que combinan elementos de los de «un solo uso» y los de «reutilización»).

Los sistemas de limpieza y desinfección se pueden convertir en casi completamente automáticos, incorporando válvulas automáticas y un sistema de control secuencial de tiempos, lo que ahorra mucha mano de obra. Si se establece además un control por ordenador, se puede lograr un sistema de limpieza in situ de control remoto, que alcanza consistentemente altos niveles de higiene. Los factores que influyen en el grado de limpieza alcanzado, tanto por desmantelamiento como por limpieza in situ, son, entre otros:

- Temperatura, composición y concentración de las disoluciones de detergente,
- Tiempo de contacto entre las disoluciones de detergente y las superficies sucias,
- Grado de turbulencia promovido, y
- Espesor y naturaleza de la capa de suciedad

La composición del detergente gobierna la capacidad de un proceso para separar los depósitos de suciedad de un sistema. Hay que seleccionar el detergente a través de pruebas de laboratorio, realizadas con el tipo de sólidos que se supone se va a encontrar, así como con el grado de deposición que se espere. La concentración y temperatura de la disolución afectan a la velocidad de reacción entre la suciedad y el detergente. La temperatura de la disolución se puede regular por inyección de vapor de agua.

En los métodos de limpieza in situ, el grado de turbulencia producido y el tiempo de circulación influyen sobre la eficacia del proceso mecánico de limpieza producido por el flujo del líquido y este efecto erosivo es el que sustituye al cepillado de la limpieza manual.



Las velocidades de flujo no deben ser, en las tuberías de tamaño corriente, menores de 1,5 m/s. También influye en la eficacia de la limpieza la calidad del agua. Si el agua es bacteriológicamente aceptable y ha sido ablandada, sólo se precisa añadir detergente; si el contenido mineral del agua es grande, hay que añadir sustancias que ablanden el agua (como el polifosfato sódico) a fin de evitar que se formen precipitados sobre la superficie de las tuberías y de los equipos. Entre los complejantes termoestables que se utilizan como ablandadores, en las formulaciones de los detergentes a utilizar a elevadas temperaturas, cabe citar el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido glucónico y sus sales. Son compuestos caros, por lo que en las nuevas instalaciones de limpieza in situ se prefiere usar aguas más blandas.

Si los depósitos de suciedad no son muy grandes, se pueden mezclar y circular conjuntamente las disoluciones de limpieza y desinfección. En la limpieza húmeda de las superficies que entran en contacto con los alimentos se utilizan, casi siempre, detergentes. Cuál sea el más apropiado, depende de la naturaleza de la suciedad a desprender y arrastrar y del material de que estén construidas las superficies a limpiar. Deben ser muy solubles en agua, a fin de evitar la deposición de sólidos indeseables. La disolución resultante no debe atacar las superficies de contacto; la corrosión se evita mediante una buena selección del detergente, teniendo en cuenta el material de construcción de las superficies a tratar.

Los riesgos de corrosión son casi nulos si están fabricadas con aceros inoxidables que, en la práctica, son los materiales automáticamente elegidos para la construcción de las tuberías y el utillaje utilizados en las fábricas en que se manipulan y elaboran productos alimenticios. Se debe recordar, sin embargo, que el acero inoxidable no es universalmente inerte a la corrosión química y que es posible usar otros materiales de construcción más baratos.

La disolución de detergente tiene que ser capaz de emulsionar o dispersar grasas y aceites, humectar adecuadamente la superficie de la suciedad y penetrar hasta la interfase de contacto entre ésta y la superficie a limpiar, a fin de desprender aquella. También debe ser capaz de disolver, o dispersar, los productos alimenticios que acompañen a los depósitos de suciedad, y ser fácil de enjuagar. En el mercado se encuentran muchos detergentes. Se pueden clasificar del siguiente modo:

- Detergentes compuestos principalmente por álcalis inorgánicos.
- Detergentes ácidos, inorgánicos u orgánicos.
- Detergentes compuestos principalmente por un agente tensioactivo (surfactante).
- Polifosfatos alcalinos, que se utilizan por su capacidad de ablandar el agua más que por su alcalinidad.

Detergentes inorgánicos alcalinos: Los detergentes alcalinos son buenos emulgentes y pueden disolver muchos sólidos de los alimentos, como las proteínas. Se incluyen entre ellos:

(a) Hidróxido sódico: La disolución de sosa cáustica es un detergente poderoso, con excelente capacidad emulgente y dispersante. Es un bactericida eficaz y se usa mucho en el lavado automático de botellas. Las disoluciones de sosa cáustica son muy corrosivas frente a algunos metales; el aluminio y el cinc son los más rápidamente atacados. Las disoluciones de hidróxido sódico ofrecen riesgos para el personal, que debe ser adecuadamente protegido.

(b) Metasilicato sódico: Es otro detergente muy útil, que tiene buena actividad humectante, emulgente y defloculante; es mucho menos corrosivo que la sosa cáustica y protege al aluminio y el estaño contra la corrosión. Con frecuencia, se utiliza mezclado con polifosfato sódico; estas mezclas son recomendables cuando la dureza del agua excede los 100 mg de $COCa_3$ /litro.

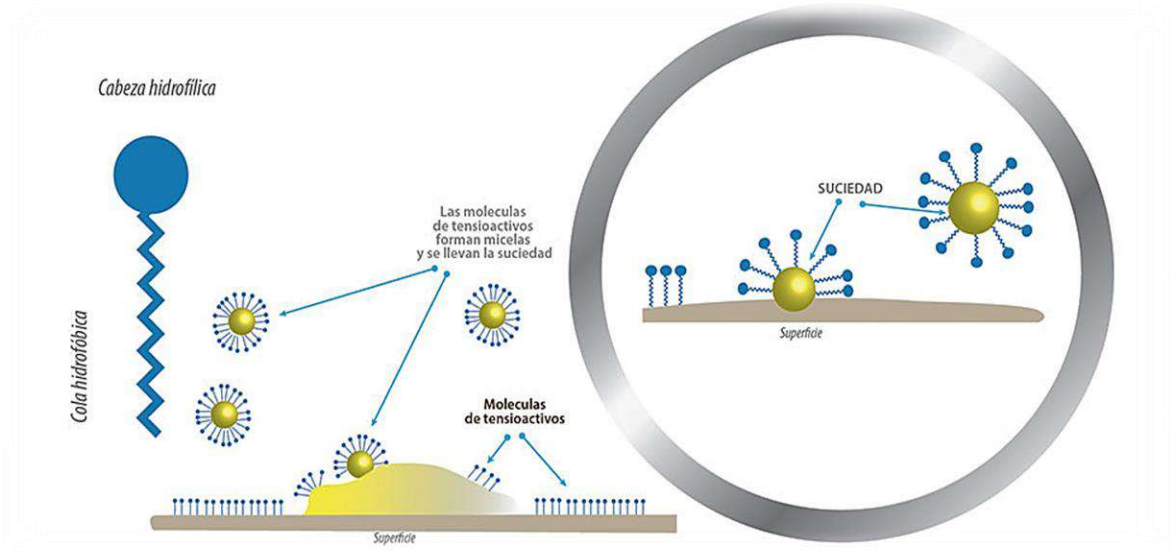
(c) Ortosilicato sódico y sesquisilicato sódico. Ambos producen disoluciones muy alcalinas, con un elevado poder saponificante. Atacan fácilmente a las grasas y a las proteínas.

El sesquisilicato es menos corrosivo que el ortosilicato, pero ambos deben utilizarse con cuidado.
(d) Fosfato trisódico: Las disoluciones de fosfato trisódico poseen excelente poder emulgente y dispersante. Es un agente ablandador del agua y, como tal, se usa conjuntamente con otros detergentes, para fines de limpieza generales.
(e) Carbonato sódico (soda): La soda, lo mismo que el bicarbonato de sodio y el sesquicarbonato de sodio, se ha utilizado como ablandador del agua y como agente de limpieza; su principal función, en muchas mezclas de limpieza, es la de tampón.

Detergentes ácidos: En los últimos años, ha crecido el uso de detergentes ácidos en la limpieza de las fábricas en que se elaboran o manipulan alimentos; su uso, sin embargo, es menos frecuente que el de los álcalis. En el pasado, se utilizaron los ácidos inorgánicos, como el clorhídrico, el nítrico y el fosfórico para desprender costras duras y, en las lecherías, las «piedras de leche» (depósitos inorgánicos compuestos principalmente por fosfato cálcico, que se forman sobre las superficies calientes durante el procesado de la leche).

Ambos tipos de depósitos son relativamente insolubles en las disoluciones alcalinas y, en cambio, desprendidos fácilmente por los ácidos. Los problemas más importantes que plantea el uso de los ácidos inorgánicos son los de corrosión de la instalación y los de seguridad del personal. Estos ácidos están siendo ahora sustituidos por ácidos orgánicos no corrosivos, como los ácidos sulfámico, cítrico, tartárico y glucónico. Los ácidos glucónico y sulfámico se usan con frecuencia para eliminar las costras que se forman en los cambiadores de calor, como los evaporadores y los pasteurizadores. Los detergentes ácidos se pueden utilizar junto con iodóforos en disoluciones de detergentes-desinfectantes.

Detergentes compuestos por agentes tensioactivos: Existen diversos agentes con actividad de superficie que se añaden con frecuencia a las formulaciones de detergentes, para reducir la actividad superficial de las mezclas resultantes. Aumentan la capacidad humectante y de penetración de las mezclas de las que forman parte y muchos son excelentes emulgentes y pueden dispersar aceites, grasas, etc. Contienen grupos hidrosolubles (hidrófilos) y grupos liposolubles (lipófilos). En presencia de sistemas bifásicos (agua-aceite o grasa), la porción hidrófila se disuelve en la fase acuosa y la lipófila en el aceite, estableciendo una fuerte interacción agua-grasa. Una corriente turbulenta de agua arrastra la emulsión del aceite o la grasa depositada en las superficies; dejándolas limpias. Existen surfactantes estables en condiciones ácidas y alcalinas. Son fácilmente solubles en agua fría y no corrosivos. Muchos surfactantes son proclives a la formación de espuma en los sistemas de limpieza in situ y, frecuentemente, se añaden a sus disoluciones agentes antiespuma.



Los agentes tensioactivos útiles en las disoluciones detergentes utilizadas en la industria alimentaria se pueden clasificar en: (a) aniónicos y (b) no-iónicos:

(a) Surfactantes aniónicos. Se usan sólo por sus propiedades detergentes. El ion activo en disolución está cargado negativamente. En el mercado se encuentran muchas variedades sintéticas, con excelente poder dispersante y humectante, especialmente útiles para la eliminación de ácidos grasos o suciedades inorgánicas (de tipo polar). No son corrosivos, pero tienden a formar espuma. Algunos tienen efectos sinérgicos con otros compuestos; la capacidad detergente de la mezcla supera a la suma de la de cada uno de ellos, por separado. No se recomienda su mezcla con los surfactantes catiónicos, porque su actividad detergente puede quedar anulada.

(b) Surfactantes no-iónicos. No se disocian en disolución, por lo que su actividad no se ve prácticamente afectada por la dureza del agua. Son poderosos emulgentes y se utilizan para emulsionar sólidos coloidales, porque son inertes frente a la carga eléctrica de los coloides. Algunos surfactantes no-iónicos tienen una gran capacidad espumante, pero otros no. Algunos son poco solubles a temperaturas altas y pueden insolubilizarse al calentar sus disoluciones. En estas circunstancias, la formación de espuma disminuye; al enfriarse se redisuelven y se enjuagan bien. En la limpieza de la industria alimentaria, se usan otros dos tipos de agentes tensioactivos:
(i) Algunos surfactantes catiónicos que, aunque son poco eficaces como detergentes, son excelentes bactericidas y se usan como desinfectantes en mezclas detergentes-desinfectantes.
(ii) Surfactantes anfóteros, que tienen una ligera actividad detergente y se usan para la limpieza de las manos y como champú para el cabello. Debe recordarse que los productos químicos destinados a la limpieza y desinfección en las instalaciones de la industria alimentaria son contaminantes potenciales de los alimentos, por lo que es vital el enjuagado final de los detergentes y los desinfectantes tras la higienización. Los estudios de la cinética del arrastre con agua demuestran que la facilidad de su eliminación de las tuberías, a juzgar por las tasas residuales tras diferentes períodos de enjuagado, disminuye en el orden: no-iónicos, amónicos, catiónicos, anfóteros.

Acondicionadores del agua (Secuestrantes/quelantes): Si, para la limpieza, se utiliza agua dura, lo más probable es que se reduzca la eficacia de la operación y se depositen costras sobre las tuberías y las superficies de los equipos. Como la dureza se debe a la presencia de sales de calcio y magnesio, la formación de costras se evitará añadiendo productos capaces de impedir la precipitación de estos iones, que suprimen también la pérdida de capacidad detergente y la formación de costra. Estos aditivos se conocen como «ablandadores del agua» y a la acción que ejercen sobre los cationes metálicos se denomina «secuestro» o «quelación». Como secuestrantes se utilizan mucho los polifosfatos sódicos. El más barato es el pirofosfato tetrasódico. Es razonablemente estable en disoluciones muy alcalinas calientes y se utiliza con frecuencia en las lavadoras automáticas de botellas y depósitos de inmersión. No es muy soluble y es un secuestrante poco eficaz del calcio. Otros dos polifosfatos, el tri- y el tetrapolifosfato de sodio, son secuestrantes eficaces, tanto del calcio, como del magnesio. Se disuelven fácilmente en agua caliente, pero pierden su eficacia a temperaturas elevadas. El hexametafosfato sódico se utiliza mucho con aguas ricas en calcio, pero es menos eficaz frente a la «dureza magnésica». Lo mismo que los tri y tetrapolifosfatos, a temperatura elevadas, se descompone dando piro y ortofosfatos, menos eficaces. Aunque sean más caros que los inorgánicos, los secuestrantes/quelantes orgánicos son muy usados, por su estabilidad al calor y su elevada solubilidad, para impedir que los componentes de la dureza se depositen sobre las superficies.

Los agentes de quelación más importantes son el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sus sales sódicas y potásicas. El gluconato y el heptanoato sódicos son secuestrantes muy potentes, en las condiciones fuertemente alcalinas necesarias para arrastrar los difíciles depósitos de proteínas. Además de evitar la precipitación de las sales responsables de la dureza, los secuestrantes/quelantes se usan para ablandar las costras ya formadas y facilitar la limpieza con detergentes.

DESINFECCIÓN (ESTERILIZACIÓN COMERCIAL)

Los métodos seleccionados para las operaciones de desinfección se han de someter a riguroso control bacteriológico. Para la desinfección, se usa el calor o los desinfectantes químicos.

Desinfección por el calor: En la termodestrucción microbiana el agua juega un papel muy importante; el calor seco es menos eficaz que el húmedo (vapor de agua o agua caliente). Para la destrucción microbiana por aire caliente, se necesitan temperaturas más altas, o tiempos de actuación más largos. Este método, es uno de los agentes desinfectantes preferidos por no ser corrosivo ni caro, por tener una gran capacidad de penetración, por no dejar residuos y por ser eficaz contra la inmensa mayoría de los microorganismos. El vapor saturado se puede hacer circular perfectamente a través de las tuberías y los equipos a ellas conectados; las pistolas de vapor se usan mucho en la desinfección de las superficies internas y externas de los componentes más voluminosos de la instalación.

Sobre los plásticos, se tienen que usar con cuidado y para eliminar todos los microorganismos, excepto las esporas bacterianas, se necesita mantener durante 1 minuto una temperatura de alrededor de 85°C; para lograr estas condiciones, puede necesitarse un precalentamiento. En los equipos de procesado, cuando no se necesita la destrucción de las esporas bacterianas, se utiliza, con frecuencia, agua caliente. De ordinario, se usan temperaturas de 85°C que se mantienen durante 15 minutos, o bien 80°C durante 20 minutos; el volumen de agua y la velocidad de flujo influyen sobre el tiempo necesario para alcanzar la temperatura de tratamiento.

Desinfección química: Además de ser capaz de destruir los microorganismos, un desinfectante químico deberá ser: estable y seguro, tanto durante su almacenamiento como durante su uso, no corrosivo, muy soluble en agua, fácil de arrastrar durante el enjuagado y con una buena relación costo/eficacia.

PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD	ACTUACIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
- Ácido peracético	- Activo frente a bacterias, hongos, levaduras, endosporas y virus.	- Oxidación y ruptura sobre la membrana externa de las bacterias, endosporas y levaduras. - El mecanismo de oxidación consiste en la transferencia de electrones de la forma oxidada del ácido a los microorganismos, dañando todo tipo de macromoléculas y provocando su inactivación y/o su muerte.	- No espumante. - Fácil enjuague. - Funcionan bien a bajas temperaturas. - Efecto microbicida completo. A bajas concentraciones (0,1-0,2%) posee una rápida acción biocida frente a todos los microorganismos - Muy utilizado en desinfección de circuitos e instalaciones CIP. - Ideal para tratamientos de choque en superficies de difícil acceso.	- Posibilidad de corrosión de metales. - Produce vapores irritantes.
- Alcoholes	- Activo frente a bacterias (gram negativas y gram positivas), micobacterias, hongos y virus. - Al aumentar el número de carbonos se incrementa su eficacia antimicrobiana, pero también su toxicidad, por lo que sólo se emplean los de bajo peso molecular: etanol e isopropanol.	- Desnaturalización de las proteínas de los microorganismos. - Entrada a través de la pared y membrana celular rompiendo estas barreras e inactivando enzimas desnaturalizando proteínas esenciales para el microorganismo en el citoplasma. - La actividad depende de la concentración, pero su gráfica es una V invertida, por lo que el máximo de eficacia se obtiene a una concentración del 60-80%.	- Acción rápida, incluso desde los 15 segundos. - Amplio espectro de actividad. - Fácil evaporación. - No dejan residuos. - Ideal para desinfecciones intermedias.	- No esporicidas. - Se inactivan por la presencia de materia orgánica. - Inicio de acción retardado. - No tienen efecto persistente.
- Aldehídos	- Activo frente a bacterias, hongos y levaduras. - A pH 7,5-8,5, viricida, tuberculicida y esporicida.	- Actúa sobre los ácidos nucleicos y las proteínas por alquilación y sobre las proteínas por desnaturalización.	- Desinfectante de alto nivel: Amplio espectro. - Poco sensibles a la presencia de materia orgánica.	- Son irritantes. - A pH > 8,5 se inactiva. - Se encuentra en proceso de revisión. - El formol está clasificado por la OMS como sustancia química cancerígena.
- Aminas terciarias	- Activo frente a bacterias, hongos, levaduras y virus. - Mayor actividad a pH alcalinos.	- Interacción con las cargas negativas de la pared celular, afectando a las proteínas tanto estructurales como enzimáticas cosa que altera las reacciones metabólicas y modifica la permeabilidad de la célula causando finalmente su muerte.	- Compatibles con detergentes aniónicos. - Presentan una elevada acción mojante, solubilizante y emulsionante. - Bajo nivel de formación de espuma que permite su utilización en desinfección de circuitos e instalaciones CIP.	- No esporicidas.
- Compuestos clorados	- Activo frente a bacterias y virus. - A mayores concentraciones, activo frente a esporas bacterianas, levaduras y mohos.	- Propiedades oxidantes que afectan a la pared bacteriana y la membrana citoplasmática. - Inhibición de reacciones enzimáticas importantes debidas a la oxidación de grupos SH de las enzimas.	- Desinfectante universal: amplio rango de actuación frente a microorganismos. - Económico. - Eficaz a baja temperatura. - Poder disolvente de grasas. - Blanqueo de superficies. - No tienen actividad residual.	- Los compuestos del cloro como las cloraminas, son tóxicos. - Altamente corrosivo para los metales. - Incompatible con ácidos y con amoníaco. - No es recomendable utilizarlo a más de 60-70ºC: se descompone a altas temperaturas. - Su actividad depende del pH: no eficaz a pH superior a 9 - Inestabilidad en presencia de materia orgánica y frente a condiciones ambientales adversas.
- Compuestos de amonio cuaternario	- Activo frente a bacterias, hongos, levaduras y virus. - A mayores concentraciones activo frente a esporas.	- Interacción con los fosfatos de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática, inhibición de la cadena respiratoria e inactivación de enzimas celulares esenciales para el crecimiento, produciendo la lisis celular.	- Buen poder humectante y detergente. - Gran sinergismo con el glutaraldehído. - Buena actividad como detergente (cierto efecto desengrasante) y permanecen activos incluso en presencia de agua dura. - Activos tanto sobre medio ácido como alcalino, aunque en éste último muestra mejores acciones.	- Incompatibles con detergentes aniónicos. - Son espumantes. - Reducen su poder desinfectante a pH < 7. - No son desinfectantes de alto nivel: más eficaces en la prevención del crecimiento de bacterias que en su destrucción. - Interaccionan con hipocloritos y derivados amoniacales.

Las disoluciones acuosas de muchos de estos productos son de fácil uso, tanto en los sistemas de limpieza in situ, como en los que exigen el desmantelamiento previo. Algunos pueden formar excesiva espuma en corrientes de flujo muy turbulento, por lo que no son recomendables para los sistemas de higienización in situ. Pueden emplearse en disoluciones diluidas frías, lo que reduce la proclividad a la corrosión que puede darse si el material de construcción y el desinfectante no son enteramente compatibles, especialmente si las técnicas de enjuagado tras la desinfección son inadecuadas. Si las superficies de contacto están limpias, la letalidad de los desinfectantes químicos frente a los microorganismos no es inferior a la del tratamiento térmico.

Los desinfectantes químicos destruyen a los microorganismos por oxidación de enzimas vitales para la estructura celular de los mismos (hipocloritos, iodóforos, ácido peracético) o por interferencia con el transporte a través de la membrana de la célula (sales de amonio cuaternario, sustancias anfóteras, etc.). Hasta hace poco, los dos grupos más populares de desinfectantes químicos utilizados en la industria alimentaria eran los compuestos que liberan cloro y las sales de amonio cuaternario. Los iodóforos y los bactericidas «anfóteros» eran más caros y se usaban menos.

En la UE y en los EEUU, los hipocloritos y los iodóforos han ido siendo sustituidos (dada su toxicidad, su tendencia a impartir olores, su potencialidad corrosiva y los riesgos derivados del contacto) por ácido peracético, cuando se requiere la destrucción de todos los microorganismos. La biguanida es otro desinfectante que ha ido ganando aceptación en la industria alimentaria. Como el ácido peracético, tiene una baja toxicidad y no es corrosivo para los aceros inoxidables. Entre los compuestos clorados, la disolución acuosa de hipoclorito sódico (ClONa es el compuesto clorado más frecuentemente usado; una disolución comercial contiene un 9-14% de cloro disponible. La concentración que se recomienda utilizar en los aparatos de acero inoxidable es de 150-250 mg /l de cloro disponible, con un tiempo de contacto de 15 minutos.

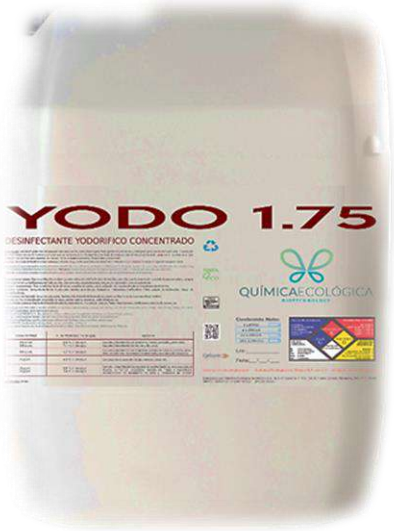
Un método de uso más adecuado para recipientes grandes, depósitos de almacenamiento, etc., consiste en rociar las superficies de contacto con una disolución que contenga 250 mg/l de cloro disponible y mantener el contacto durante 5 minutos. Para conseguir la máxima humectación, se debe empezar el rociado de la superficie por el punto más bajo y seguir hacia arriba. Los cambiadores de calor de acero inoxidable son muy sensibles al ataque por las disoluciones de hipoclorito y, dado el riesgo de corrosión, los equipos metálicos no se deben mantener en contacto con las disoluciones desinfectantes que contengan cloro, durante mucho tiempo, antes del enjuagado. En los aparatos de aluminio, no se debe superar la concentración de 200 mg/l de cloro disponible. En la industria alimentaria se usan también las disoluciones de hipoclorito cálcico (Cl02Ca), cloro gaseoso y cloraminas. Las cloraminas son menos corrosivas y más estables que el cloro y los hipocloritos. A las concentraciones recomendadas, el cloro ejerce una rápida acción bactericida contra las Gram-positivas y las Gram-negativas, dejando residuos que no son tóxicos (cloruro sódico). Uno de los inconvenientes de las disoluciones de hipocloritos es el hecho de que su eficacia bactericida disminuye en presencia de materia orgánica. Por ello, antes de la desinfección, hay que limpiar y escurrir por completo las superficies, hasta que no queden restos de los detergentes orgánicos utilizados.

Por su parte, los compuestos de amonio cuaternario, son más caros que los hipocloritos, pero su uso, para casos en los que puede tolerarse la formación de espuma, está bien establecido.

Son desinfectantes catiónicos, en los que parte o todos los átomos de hidrógeno del radical [NH4]+ han sido sustituidos por grupos alquílicos o arílicos, uno de los cuales es un grupo de cadena larga. El anión inorgánico suele ser cloro o bromo, como, por ejemplo, en el «bromuro de alquiltrimetil amonio» y el «cloruro de lauril dimetil bencil amonio». Estos desinfectantes matan a los microorganismos, fijándose fuertemente a las membranas celulares e impidiendo el transporte, a su través, de nutrientes o productos celulares de desecho.

Son muy eficaces contra las bacterias Gram-positivas y, hasta cierto punto, menos contra las Gram-negativas, siempre que actúen conjuntamente con un secuestrante. La eficacia bactericida de algunas sales de amonio cuaternario se reduce en presencia de materia orgánica, aunque otras retienen, en estas condiciones, su poder letal contra los microorganismos. Debido a su carácter catiónico, las sales de amonio cuaternario no se deben mezclar con detergentes aniónicos y las superficies de contacto deben liberarse de surfactantes aniónicos antes de su desinfección con una sal de amonio cuaternario. Estos compuestos se pueden adquirir como polvos y pastas, aunque se prefiere utilizarlos en disolución acuosa.

Son estables al calor, incoloros, inodoros y no son tóxicos ni dejan olores a las concentraciones adecuadas para su uso. Las sales de amonio cuaternario tienen notable tendencia a formar espuma, especialmente durante el bombeo, en los sistemas de limpieza in situ. Se les puede añadir antiespumante, pero resulta caro y no siempre es eficaz. Las sales de amonio cuaternario (en especial cuando el anión es cloro) pueden ser corrosivas y atacar tanto al aluminio como a los aceros inoxidables.

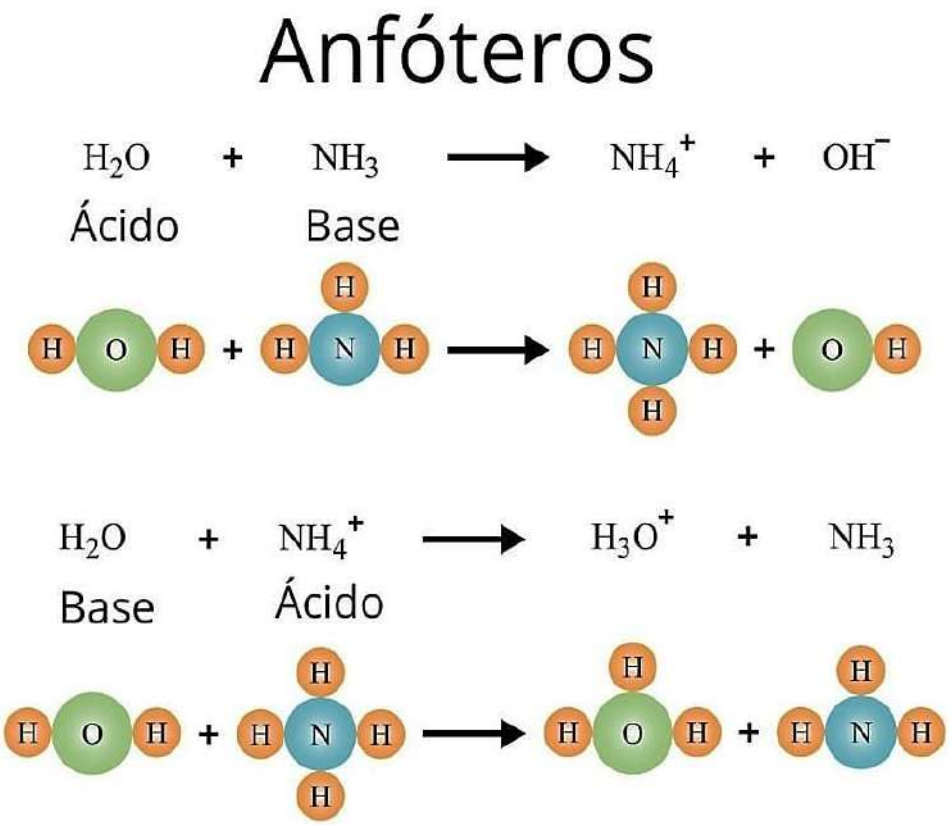


Los Iodóforos o Yodóforos, son complejos solubles de sustancias tensioactivas y yodo. Los surfactantes son habitualmente no iónicos, aunque se pueden usar algunos aniónicos y catiónicos. Pueden formularse de manera que posean propiedades detergentes, además de bactericidas. Son caros, pero se usan bastante como detergentes-desinfectantes, especialmente en la industria láctea. Las disoluciones ácidas de iodóforos tienen, en frío, una rápida acción bactericida frente a un amplio rango de bacterias. Se utilizan habitualmente con ácido fosfórico y son más activas en el intervalo de pH 3-5.1 Los iodóforos no se ven afectados por la dureza del agua. Son estables y, aunque con frecuencia se consideran atóxicos, las disoluciones concentradas deben etiquetarse como corrosivas y deben ser manipuladas con cuidado. Tras el aclarado, los iodóforos no suelen dejar manchas, ni olores o sabores desagradables. Se dice que algunos plásticos y gomas se decoloran tras su exposición a los iodóforos, debido a la absorción de yodo y para evitar esta posibilidad, deben procurarse contactos no muy prolongados entre estos materiales y las disoluciones de iodóforos. Los iodóforos son corrosivos para todos los metales utilizados en la industria alimentaria, incluso el acero inoxidable, por lo que la industria láctea se ha inclinado durante los últimos años por utilizar ácido peracético.

En otro apartado, tenemos a los bactericidas anfolíticos o surfactantes anfóteros, que poseen propiedades detergentes; algunos tienen excelente capacidad humectante y gran poder de penetración y los hay que son moderadamente bactericidas. Son sustancias orgánicas (habitualmente aminoácidos sustituidos o betaínas) que contienen grupos ácidos y básicos. Según el pH de la solución, pueden exhibir un comportamiento amónico o catiónico. En este último caso, es cuando muestran sus propiedades bactericidas. No son corrosivos ni tóxicos y se ven poco influidos por la dureza del agua, pero, además de ser caros, tienen gran tendencia a formar espuma y se consideran inadecuados para la limpieza y desinfección in situ.

CONTROL BACTERIOLÓGICO

Los métodos de limpieza y desinfección seleccionados para las operaciones de higienización se han de someter a riguroso control bacteriológico. Por ellos, los distintos protocolos utilizados deben ser refutados en sus mecanismos de acción y con métodos para comprobar su eficacia desinfectante.



La limpieza y el saneamiento son requisitos reglamentarios clave en el sector alimentario. La retirada de muchos productos se debe a prácticas sanitarias deficientes y, en un alto porcentaje de casos, guarda relación con incidencias de contaminación cruzada por **Salmonella spp y Listeria monocytogenes** en una planta de producción de alimentos. Ejemplo de ello, puede ser la sección 117 del título 21 del Código de Reglamentos Federales (CFR) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (**FDA**), la cual evidencia la importancia de la limpieza periódica para evitar el contacto cruzado con alérgenos y la contaminación cruzada de productos alimentarios. La sección 117.35, sobre operaciones sanitarias, aclara que las superficies de los equipos que entran en contacto con alimentos deben limpiarse e higienizarse según necesidad, y que las superficies que no entran en contacto con alimentos deben limpiarse periódicamente.

Asimismo, la normativa del Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos (**FSIS**) estadounidense, basada en tres leyes federales relativas a la inspección del embalaje de carga, envasado y etiquetado de productos cárnicos, aves y huevos, enfatiza también la necesidad de una limpieza y un saneamiento adecuados para garantizar las condiciones sanitarias necesarias para producir alimentos inocuos.

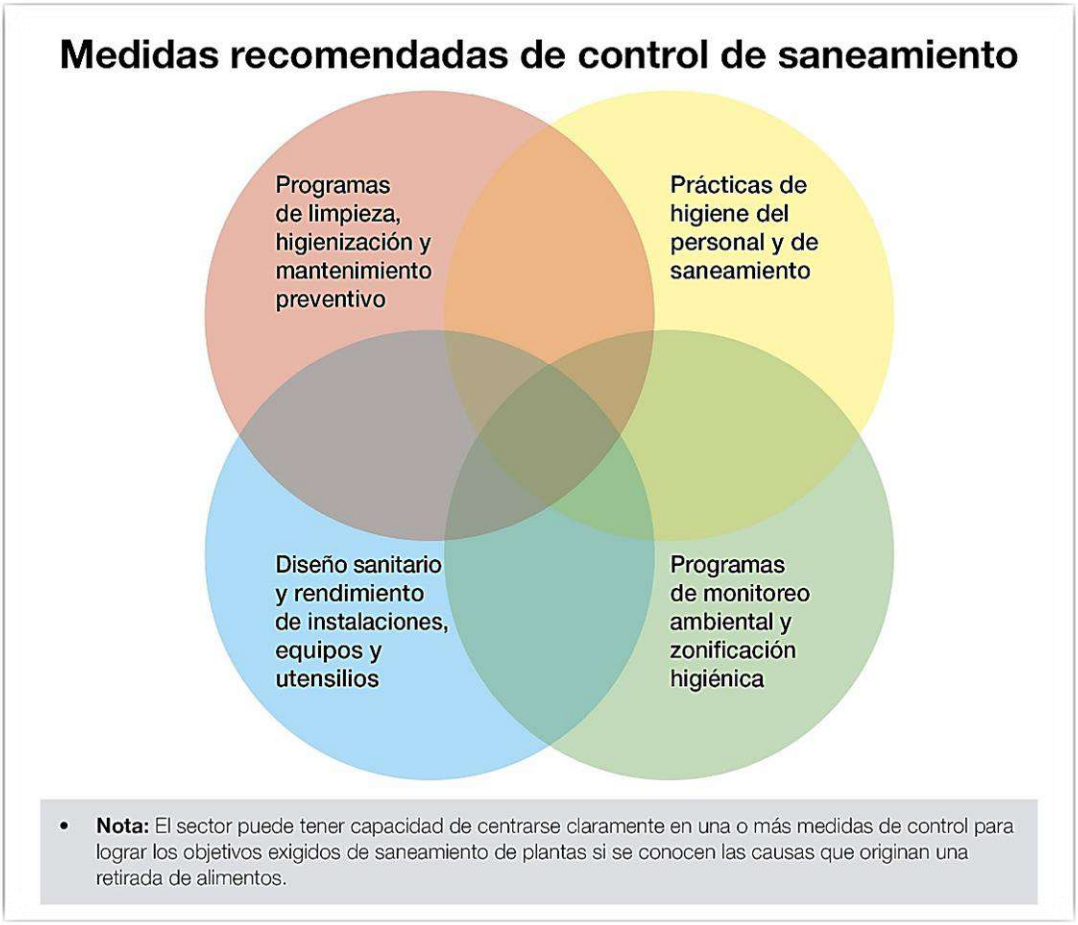
En Europa, el Reglamento (**CE**) n.º 178/2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, impone una serie de obligaciones generales relativas a la provisión de alimentos inocuos. Además, de acuerdo con el Reglamento (CE) n.º 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios, las empresas alimentarias deben aplicar procedimientos para impedir la puesta en el mercado de alimentos que no sean seguros. Con arreglo a estas normativas internacionales, los productores de alimentos, las empresas de catering y otras empresas de la cadena alimentaria son responsables de y están obligadas a lo siguiente:

- Proveer alimentos inocuos.
- Aplicar procedimientos para impedir la puesta en el mercado de alimentos que no sean seguros (entre ellos controles de saneamiento apropiados).
- Poder garantizar la trazabilidad de sus alimentos (un paso anterior y un paso posterior).
- Retirar alimentos que no sean seguros.
- Cooperar con las autoridades competentes.

Las normas de certificación basadas en las orientaciones de la **GFSI** han proporcionado una serie de parámetros de referencia para armonizar los programas mundiales de inocuidad alimentaria conforme a un nivel acordado de expectativas en el sector. Las normas comunes se centran, en gran medida, en el uso de los tipos de utensilios de limpieza correctos, como se recoge a continuación:

- La **Norma Mundial de Inocuidad Alimentaria del BRC**, en su cláusula 4.11.6, indica lo siguiente: “Los equipos de limpieza deberán estar diseñados de manera higiénica y ser aptos para los fines previstos, estar debidamente identificados para el uso previsto (por ejemplo, con códigos de color o etiquetas), y limpiarse y conservarse en condiciones […] a fin de prevenir la contaminación”.
- El **Código SQF**, en la cláusula 10.2.9.8, estipula lo siguiente: “Los equipos […] deberán limpiarse después de su uso o con una frecuencia determinada para controlar la contaminación, y almacenarse en condiciones de limpieza y buen estado que minimicen el riesgo de contaminación microbiológica o por contacto cruzado con alérgenos”.
- Parte de la norma **FSSC 22000**, la cláusula 11.2 de la norma ISO 22002 (Programas de Prerrequisitos para la Inocuidad Alimentaria. Parte 1: Elaboración de Alimentos) establece, con respecto a los agentes y utensilios de limpieza e higienización, lo siguiente: “Los utensilios y equipos deberán poseer diseño higiénico y mantenerse en un estado que no represente una fuente potencial de materia extraña”.

Durante el proceso de saneamiento, la limpieza manual de superficies y equipos resulta inevitable. Se debe a que no todos los equipos e instalaciones de un entorno de producción de alimentos están diseñados para su limpieza in situ (CIP) o mediante otros métodos automatizados, y son precisamente los que necesitan limpiarse y desinfectarse manualmente. El saneamiento no consiste solo en limpiar y desinfectar las superficies y los equipos, sino que debe considerarse una metodología holística basada en el riesgo, dirigida a minimizar considerablemente o evitar la contaminación cruzada de productos (por alérgenos, microbios y cuerpos extraños) en las instalaciones.



Esta lista de prácticas recomendadas del sector puede ser de utilidad para desarrollar un programa de saneamiento integrado:

- **Codificación por color:** Usar utensilios de un solo color en zonas higiénicas diferenciadas o en zonas de alérgenos, o para diferenciar los utensilios usados para limpiar superficies en contacto con alimentos o sin contacto con alimentos.
- **Zonificación higiénica:** Aplicar un buen enfoque de zonificación que separe los productos crudos de los acabados y los productos alergénicos de los no alergénicos; esto contribuirá a evitar o reducir considerablemente las incidencias de contaminación cruzada. Los estándares de zonificación adecuados también son compatibles con los programas de control y monitoreo ambiental.
- **Diseño higiénico:** Las superficies, los equipos y los utensilios de diseño y construcción higiénicos de unas instalaciones se limpian con mayor rapidez y facilidad después de su uso y representan un menor riesgo de anidación y transferencia de contaminantes.
- **Gestión del flujo de procesamiento:** La limpieza manual y los utensilios que se emplean para llevarla a cabo optimizan los procesos, ya que, en parte, la correcta selección, almacenamiento, limpieza y cuidado de los utensilios evita incidencias de contaminación en las plantas de producción de alimentos.
- **Método 5S:** Los métodos de organización del lugar de trabajo que incorporan elementos para clasificar, ordenar, limpiar, estandarizar y mantener la disciplina a un programa de limpieza manual también resultarán beneficiosos.

La segregación de los equipos de limpieza, los utensilios de manipulación de alimentos y otros instrumentos y utensilios en áreas codificadas por color bien estructuradas permite lograr metas más ambiciosas en el campo de la seguridad alimentaria, ya que contribuye a reducir el riesgo de contaminación cruzada entre zonas. La codificación por color es fácil de implantar si se lleva a cabo correctamente desde el principio. La codificación por color garantiza una mayor seguridad alimentaria al facilitar la separación eficaz de los procesos, las zonas y los equipos en instalaciones de producción de alimentos, minimizando así la contaminación cruzada. La codificación por color se puede incorporar a los procesos de trabajo como parte natural de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), o bien como una etapa proactiva de reducción de riesgos que forme parte del catálogo de prerrequisitos del sistema HACCP.

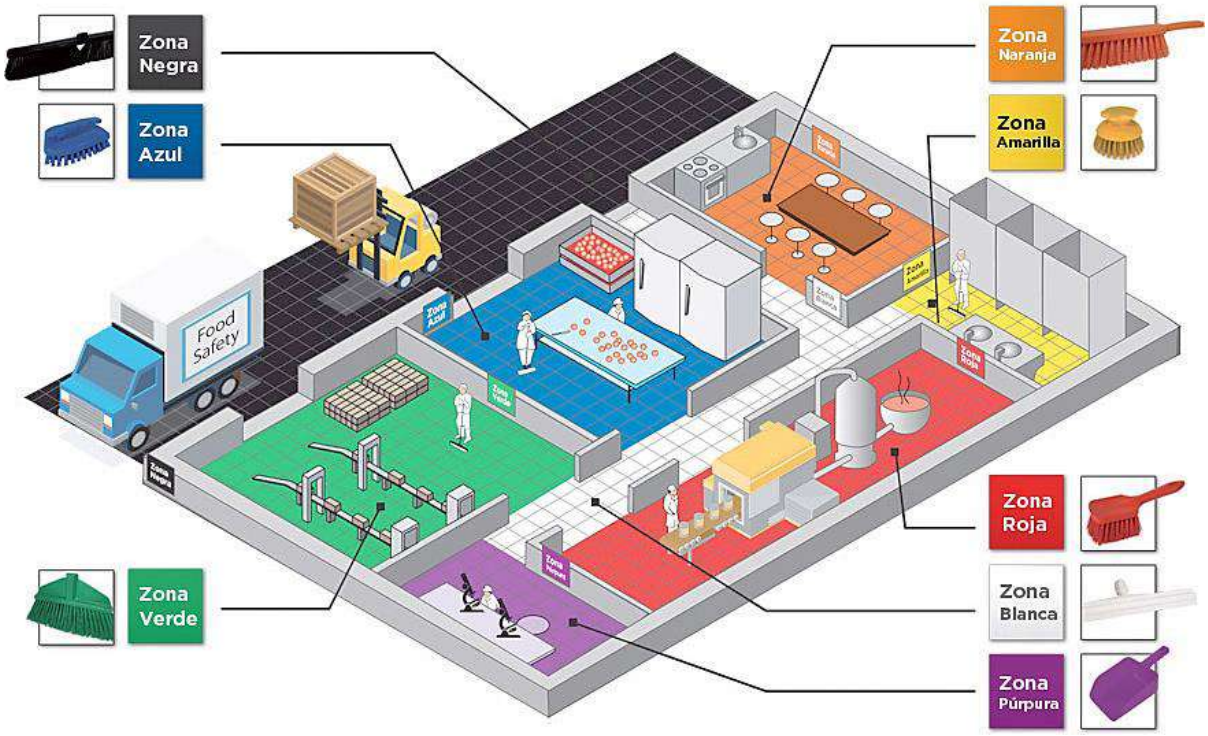
Codificando por color, se minimiza el riesgo de contaminación de los productos por microorganismos, alérgenos o cuerpos extraños mediante la separación de los pasos, las secciones y las áreas que componen el proceso de producción de alimentos. Se reducen los riesgos y costes asociados al rechazo y la retirada de productos, dado el menor riesgo de contaminación cruzada de los productos acabados. Se agilizan los procesos al garantizarse la facilidad de localización de los equipos y su almacenamiento en el lugar apropiado. Este planteamiento se ajusta también a los principios del sistema HACCP en materia de seguimiento y control.

Se eliminan los malentendidos. Un sistema de codificación por color es fácil de entender y aprender, independiente- mente de las habilidades lingüísticas. Se mejora la seguridad mediante el fomento de una cultura que invita a los empleados a hacerse responsables de sus equipos y zonas de trabajo. Se prolonga la vida útil de los equipos al garantizarse su correcto almacenamiento en ganchos, soportes o tableros de sombras. Se reducen los costes asociados a la sustitución de los equipos, pues duran más tiempo. Se reduce el número de utensilios y equipos necesarios para la producción de alimentos. Se crea un área de trabajo bien organizada y ordenada, clara y visiblemente centrada en la seguridad alimentaria. Ello causa una impresión positiva en clientes, autoridades, auditores y otros visitantes. Antes de empezar a usar la codificación por color en las instalaciones de producción de alimentos, es fundamental tomar en cuenta las siguientes preguntas:

¿Cuáles son los peligros potenciales asociados a mis instalaciones de producción de alimentos?: Deben identificarse todos los peligros potenciales para la seguridad alimentaria (alérgenos, microorganismos, cuerpos extraños, etc.) que puedan presentarse en las instalaciones de producción en función del tipo de alimento que se produzcan, sus procesos de producción, el segmento al que pertenezcan sus clientes, la legislación y las certificaciones que deba recibir. Si se tiene un plan HACCP, ya se habrán identificado tales peligros y evaluado los riesgos asociados a los mismos.

¿Corro riesgo de que mis productos sufran contaminación por alérgenos?: Si la respuesta es afirmativa, la solución ideal en cuanto a codificación por color es asignar un código de color específico a los utensilios y equipos destinados al contacto con alérgenos.

¿Están mis instalaciones de producción de alimentos divididas en zonas?: Si las instalaciones de producción ya están divididas en zonas, puede basar la codificación por color en tales zonas, siempre y cuando tenga sentido hacerlo. Asignar a cada zona su propio color para facilitar la identificación de los equipos y utensilios que pertenezcan a cada zona, y mantener estos aislados entre sí. La división en zonas también se puede aplicar a las líneas de producción para limitar el riesgo de contaminación cruzada entre aquellas. Este tipo de control por zonas consiste en asignar un determinado color a los equipos destinados exclusiva- mente al uso en un área y/o una línea de producción en particular.



El contraste entre colores facilita la detección de fragmentos de plástico o cerdas sueltas depositados por los equipos en los alimentos. Por supuesto, los equipos de limpieza y utensilios que se empleen para manipular alimentos deben inspeccionarse y sustituirse en cuanto comiencen a presentar signos de desgaste. Usar combinaciones fáciles de distinguir para daltónicos. Uno de cada 12 hombres y una de cada 200 mujeres padecen daltonismo. Asegurar de que los tonos contrasten para que aquellos empleados que padezcan daltonismo puedan diferenciar los colores con facilidad. En caso de duda, tomar una foto de los colores y convertir a blanco y negro. Si se pueden notar las diferencias, el contraste entre tonos será lo suficientemente marcado.

Se recomienda no combinar colores en utensilios o grupos de utensilios concretos; en su lugar, es mejor asignar el mismo color a los mangos y los cabezales de escoba/jalador. Asimismo, se debe limitar al máximo el número de colores. No tratar de asignar un color diferente a cada uno de los pasos de un proceso complicado. Si el sistema de codificación por color es demasiado complejo, los empleados no lo entenderán ni lo respetarán. Los colores que se seleccionen deben tener sentido para los empleados. Si es posible, seleccionar colores que puedan asociarse por lógica a zonas específicas o ingredientes concretos.

Implantar el sistema de codificación por color en todas las zonas afectadas al mismo tiempo. Para mayor claridad, establecer una fecha específica para la supresión gradual del sistema antiguo y una fecha de entrada en vigor concreta para el nuevo sistema codificado por color. Comunicar el plan a todos los intervinientes. Reunirse con todos los jefes de turno en primer lugar para asegurarse de que comprenden el sistema y, a continuación, ampliar el programa a los demás empleados. Seleccionar colores que se ajusten a todos los requisitos de limpieza y manipulación de alimentos.

Se recomienda usar colores estándar **(verde, azul, rojo, blanco y amarillo)** para las zonas codificadas por color más extensas que requieran numerosos tipos de equipos de limpieza y utensilios de manipulación de alimentos. Análogamente, se recomienda usar otros colores (rosa, naranja, púrpura, lima, etc.) para áreas más pequeñas, caracterizadas por su alto riesgo y centradas en el control de alérgenos, en las que se requieran menos equipos de limpieza y utensilios de manipulación de alimentos. El color de los utensilios debe coincidir con el de las áreas de almacenamiento. Asegurarse de que los utensilios se almacenen en la misma área en la que se usen, e implantar un sistema de almacenamiento codificado por color mediante, por ejemplo, tableros de sombras o portautensilios. Elegir un color para los equipos de limpieza y los utensilios de manipulación de alimentos que entren en contacto con superficies en contacto con alimentos y los propios alimentos, y un color diferente para los equipos y utensilios que no lo hagan. Además, seleccionar un color específico para la limpieza de drenajes. No existen normas ni reglamentos que determinen los colores que deben emplearse en instalaciones de producción de alimentos. Para gozar de mayor seguridad alimentaria, se recomienda elegir colores que contrasten claramente con los alimentos producidos. En zonas sin contacto con alimentos, se podría emplear el color verde para identificar los equipos de limpieza que se usan en el suelo, mientras que en las zonas en contacto con alimentos, el azul es el color que se asigna con mayor frecuencia a los equipos de limpieza y los utensilios de manipulación de alimentos que entran en contacto con superficies sobre las que se procesan alimentos, dado que muy pocos alimentos son de dicho color. El negro es el color que se asigna con mayor frecuencia a los drenajes, las áreas de ingeniería y las zonas exteriores, pues no permite apreciar la suciedad. Por otro lado, pueden elegirse otros colores (rosa, naranja, púrpura) para diferenciar entre los utensilios destinados a la limpieza de alérgenos concretos. Para sectores de almacenamiento, usar utensilios de colores más discretos (marrón o gris) en áreas de alta visibilidad, como los pasillos.

Uno de los principales puntos identificados para el aislamiento de patógenos son los equipos de limpieza. Una vez contaminado, el propio equipo de limpieza puede luego convertirse en un vector de contaminación, es decir, puede difundir la contaminación en el entorno, aumentando el riesgo subsiguiente de contaminación cruzada a los alimentos. Además, los equipos susceptibles de entrar en contacto con alimentos y con superficies destinadas al contacto con estos deberían fabricarse con materiales que no presenten riesgos para el consumidor. Entre estos riesgos están los que suponen la migración de sustancias químicas nocivas y la presencia de cuerpos extraños. Resulta por tanto imprescindible que los equipos de limpieza se fabriquen con materiales seguros para el contacto con alimentos y se diseñen de modo que se minimicen dichos riesgos.

Muchos de los equipos de limpieza actualmente en uso en la industria alimentaria no poseen un buen diseño higiénico, lo cual incrementa el riesgo de contaminación cruzada. No cabe duda de que la aplicación de unos buenos criterios de diseño higiénico contribuiría a reducir este riesgo y entre ellos podemos nombrar:

- ausencia de hendiduras y trampas de contaminación (por ejemplo, mediante el uso de uniones suaves), orificios pequeños, huecos y ángulos internos pronunciados;
- acabado superficial suave;
- facilidad de limpieza y secado (por ejemplo, ofreciendo rapidez y sencillez de desmontaje/ montaje, diseño en una sola pieza o fácil acceso a todas las áreas para su limpieza y desinfección);

- fabricación con materiales seguros para el contacto con alimentos (evitando la madera, el vidrio y los materiales tóxicos);
- construcción adecuada (el producto debe ser duradero y no incorporar espumas, pinturas o revestimientos);
- ausencia de porosidad;
- resistencia adecuada a temperaturas y agentes químicos.

Como se ha mencionado anteriormente, un mal diseño higiénico de los equipos de limpieza puede aumentar el riesgo de contaminación cruzada de los productos alimenticios por microbios, alérgenos y cuerpos extraños. Recientemente, la detección de trazas o incluso grandes niveles de contaminación de carne de caballo en los productos vacunos ha afectado a los estándares de limpieza en lo que respecta a la contaminación cruzada entre especies.

La Agencia de Estándares Alimentarios del Reino Unido (**FSA**, por sus siglas en inglés), basándose en los hallazgos de un proyecto para establecer si se producía cruce de especies en las plantas procesadoras de carne británicas durante la producción de carne picada aplicando las prácticas correctas, ha establecido hace poco un límite del 0,1 % de carne de porcino cruda en la carne de vacuno cruda (al peso). Este precedente puede aplicarse perfectamente a otras formas de contaminación cruzada residual en los alimentos. Por ejemplo, productos que no sean halal o kosher, alimentos modificados genéticamente, restos de carne en productos vegetarianos, etc. Como resultado, los estándares de limpieza en estas áreas estarán bajo escrutinio.

Todo ello, unido a las nuevas recomendaciones de la 9.ª edición (2022), de la Norma mundial de seguridad alimentaria del **BRC**, donde se detalla que “los equipos de limpieza deberán estar diseñados de manera higiénica para los fines previstos”, pone de manifiesto la necesidad de emplear equipos de limpieza eficaces y diseñados higiénicamente para ayudar a maximizar la eliminación de contaminantes y residuos en los alimentos, minimizar el riesgo de contaminación cruzada y cumplir con los requisitos de auditoría del BRC.

AZUL
CLAVE PARA LA LIMPIEZA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA
No se produce naturalmente en los productos alimenticios.
Se utiliza muy a menudo para objetos de uso cotidiano.
Permite la detección visual de posibles contaminantes alimenticios. Siendo un color contrastante.

VERDE
Se puede utilizar en todas las áreas productivas.
Se emplea para CONTRASTAR CUALQUIER TIPO DE ALIMENTOS
Excepto de color verde, como las verduras.
Lo emplean para identificar utensilios que se ocupan para el tallado de pisos.

BLANCO
ÁREAS DE ALTA HIGIENE
Interior de equipo.
Contacto directo con el producto.
De alto contraste para identificar suciedad.

AMARILLO
Implementación por zona: se puede usar por lógica para el trigo y la panadería.
Áreas de menor riesgo de contaminación.
Carnes crudas. Control de alérgenos.
Implementación por elementos:
Lavamanos
Duchas
Tuberias

ROJO
Implementación por zona: se puede usar por lógica para la carne cruda.
ÁREAS CON MAYOR RIESGO DE CONTAMINACIÓN
Áreas propoagación de microrganismos patógenos.
Implementación por elementos: Para limpiar pisos y desinfectar sanitarios.

NARANJA
RECOMENDAMOS USARLO EN ÁREAS DE PRODUCCIÓN DE ALÉRGENOS
Permite la detección visual de posibles contaminantes alimenticios, siendo un color llamativo y contrastante.
Se puede utilizar en incidentes de rompimiento de vidrio. Evitando el riesgo de contaminación con otros utensilios.

CAFÉ
Limpieza de motores.
ÁREAS DE MANTENIMIENTO.
Limpieza de transporte.
Extensiones de la planta.

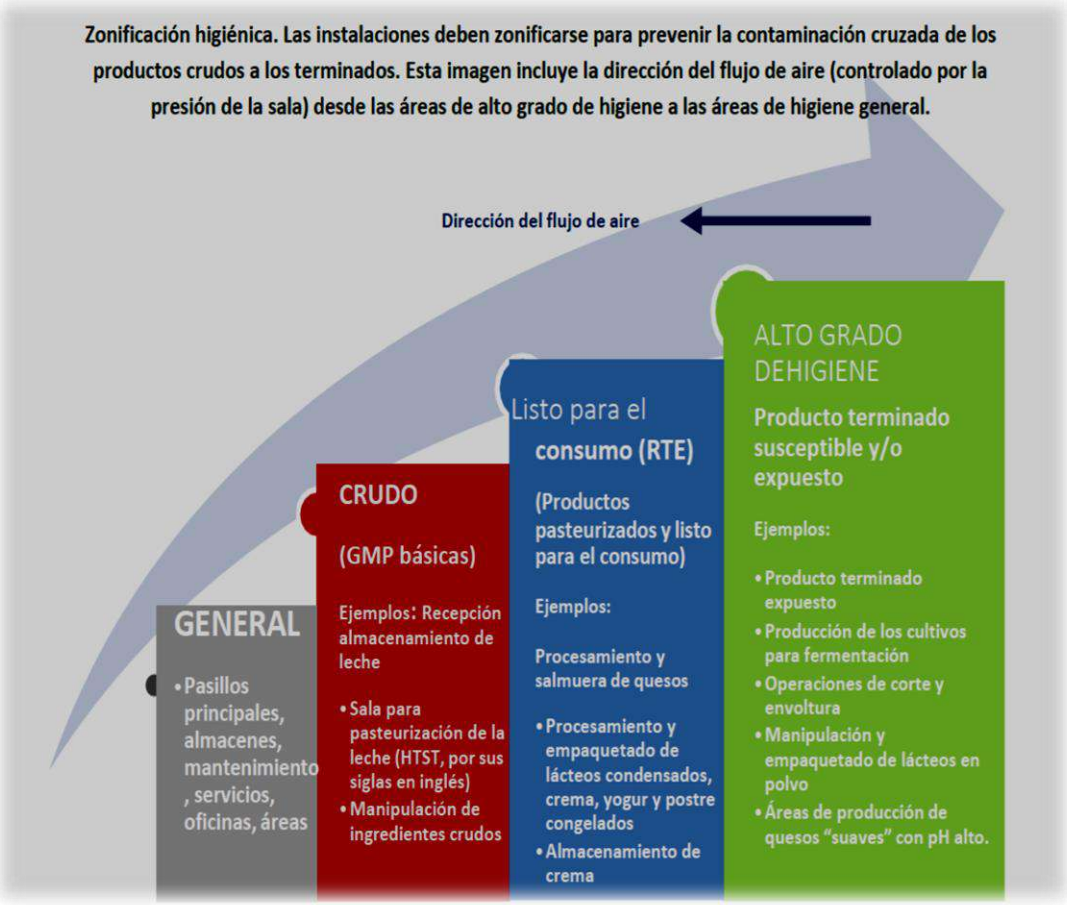
GRIS
Es un color discreto.
ÁREAS DE MANTENIMIENTO
Se puede usar en áreas de alta visibilidad.
Zonas exteriores de la planta.

MORADO
En áreas menos críticas.
PUEDE SER USADO PARA EXTERIOR DE EQUIPOS.
Incluso en contacto con materia prima.
Ej. Afuera de la mezcladora, zonas que no tocan el alimento.

ROSA
También se puede utilizar en áreas no tan sucias.
SE USA PARA INTERIOR DE EQUIPOS.
Es un color que contrasta para muchos tipos de materia prima.
Como alternativa para oficinas.

NEGRO
PARA DRENAJES, TALLERES Y ZONAS EXTERIORES
Áreas ajenas a la producción

9. Zonificación higiénica



Uno de los programas prerrequisitos requeridos en cualquier sistema de Gestión de Inocuidad de Alimentos es el Programa de Monitoreo Ambiental (PMA). Muchas veces no tenemos idea de por dónde comenzar a elaborar el programa y un buen inicio es zonificar nuestras áreas de producción. Una forma viable de identificar las fuentes de contaminación en las instalaciones alimentarias es aplicar el concepto de **zonificación higiénica** al monitoreo ambiental. De esta forma se identifican las diferentes áreas en un entorno de procesamiento de alimentos que tienen diferentes niveles de riesgo y esto se puede utilizar para seleccionar puntos para el programa de muestreo ambiental.

La zonificación higiénica se utiliza para identificar las áreas de mayor riesgo (Zona 1) a las de menor riesgo (Zona 4) y diferenciar los requisitos de saneamiento en las diferentes zonas. El enfoque de zonificación higiénica está diseñado como un objetivo con el círculo central (o la diana) designado como Zona 1 que representa la zona de mayor riesgo y las áreas más críticas para el monitoreo ambiental y la limpieza y desinfección. Lo ideal es tomar un mapa de las áreas de proceso e identificar las diferentes zonas con colores (mapeo), definiendo así los puntos que vamos a muestrear, con qué frecuencia, y qué parámetros vamos a medir. Debemos definir los límites y las acciones correctivas que vamos a tomar cuando los parámetros se salgan de esos límites establecidos. Muchas veces surge la duda acerca de la fuente de esos límites, la verdad es que deberíamos establecer un muestreo por un tiempo y definir la línea base para nuestra planta porque todas las áreas de proceso tienen sus propias realidades.

La contaminación del equipo puede ocurrir durante la operación o cuando el equipo está inactivo. Aunque el equipo tenga un diseño sanitario, pueden alojarse microorganismos. La contaminación del equipo se reduce mediante la limpieza y desinfección adecuada. Los operarios que no siguen las prácticas sanitarias contaminan los alimentos con microorganismos patógenos. Las manos, el cabello, la nariz y la boca albergan microorganismos que pueden transferirse a los alimentos durante el procesamiento, envasado, preparación y servicio al tocarlos, respirarlos, toser o estornudar.

El agua se usa en la producción y preparación es un ingrediente agregado en la formulación de varios alimentos procesados y sirve como un componente clave de la operación de limpieza y desinfección, pero también puede convertirse en fuente de contaminación. La contaminación puede resultar de microorganismos transportados por el aire en las áreas de procesamiento, envasado, almacenamiento y preparación de alimentos. Esta contaminación puede resultar del aire sucio que rodea la planta de alimentos o de la contaminación por prácticas sanitarias inadecuadas. Los métodos más efectivos para reducir la contaminación del aire son las prácticas sanitarias, el filtrado del aire que ingresa a las áreas de procesamiento y preparación de alimentos y la protección del aire mediante técnicas y materiales de empaque adecuados.

Si las aguas residuales sin tratar se drenan o fluyen hacia líneas de agua potable, pozos, estanques de riego, ríos, lagos y bahías oceánicas, el agua y los organismos vivos como los mariscos se contaminan. Para prevenir esta contaminación, las operaciones de producción de animales grandes, letrinas y fosas sépticas deben estar lo suficientemente separados de los pozos, arroyos y otros cuerpos de agua. Las aguas residuales no deben aplicarse a los campos donde se cultivan frutas y verduras. Moscas y cucarachas están asociadas con los hogares, los establecimientos de comida, las instalaciones de procesamiento de alimentos y los almacenes de alimentos, así como con los inodoros, la basura y otras suciedades. Estas plagas transfieren la suciedad de las áreas contaminadas a los alimentos a través de sus productos de desecho; boca, pies y otras partes del cuerpo; y con moscas, durante la regurgitación de suciedad sobre alimentos y equipos limpios.

El primer paso para comprender la actividad de los patógenos ambientales es entender cómo se comportan los microorganismos en un ambiente alimentario. A grandes rasgos, existen dos tipos básicos de contaminantes: **microorganismos transitorios y microorganismos residentes**. Los microorganismos transitorios pueden ingresar a las instalaciones a través de ingredientes, materias primas, personal u otros elementos, es decir, “hacen autostop''. Las actividades normales de limpieza y desinfección deberían eliminar las cepas transitorias, de modo que no subsistan ni se establezcan en las instalaciones alimentarias. Aún con buenos procesos de saneamiento, las cepas transitorias aparecen de vez en cuando en este tipo de establecimientos y pueden detectarse en ciertas ocasiones a través de pruebas, lo que es previsible.

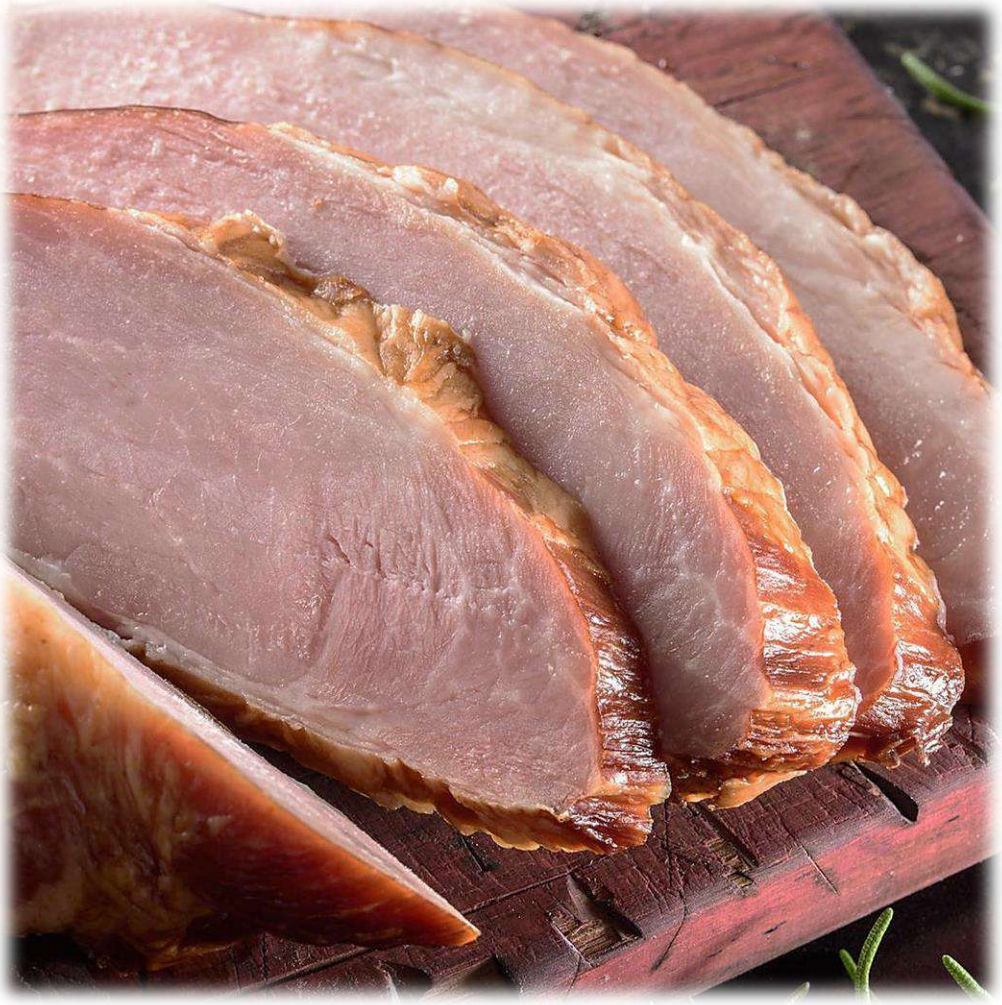
Por otra parte, los microorganismos residentes se establecen en el entorno de procesamiento de los alimentos. Se albergan en rincones y grietas, llamados nichos o refugios ambientales, y subsisten durante largos periodos. Estos nichos son difíciles de limpiar, por lo que una cepa residente puede formar una colonia que contamina los alimentos de forma regular.

El objetivo de la zonificación higiénica es reducir las posibilidades de que un organismo transitorio ingrese en áreas sensibles dentro de las instalaciones, como áreas de envasado en las que los productos listos para el consumo se ven expuestos al ambiente. Los objetivos de un programa de monitoreo ambiental, en definitiva, son:

- verificar que los planes de zonificación higiénica sean eficaces y
- detectar nichos ambientales, a fin de aplicar medidas correctivas para eliminar las cepas residentes.

Esto requiere aplicar prácticas estrictas de saneamiento y comprender la importancia de establecer un plan riguroso para detectar cepas residentes.

La necesidad y el alcance de la zonificación y el monitoreo ambiental depende del producto. Por lo general la técnica se aplica en instalaciones que producen alimentos listos para el consumo. Por ejemplo, las necesidades de una molienda de harina son muy diferentes de las de una instalación alimentaria frigorífica de productos listos para el consumo y de las de una planta de alimentos enlatados. Cada instalación debe determinar la necesidad y el alcance de un programa de zonificación con base en el riesgo potencial de sus productos. La evaluación debe tener en cuenta la estructura, el personal, los flujos de tráfico de ingredientes y embalaje y cualquier área de contaminación cruzada.



También se deben considerar posibles contaminantes presentes en la materia prima, el flujo de aire, las áreas de soporte y las actividades que se llevan a cabo en las instalaciones. La zonificación puede implementarse en una instalación con fines de inocuidad alimentaria o calidad (por ejemplo, controlar la contaminación con moho); no obstante, los controles preventivos de saneamiento solo deben dirigirse a patógenos ambientales relevantes para el producto en cuestión (por lo general alimentos listos para el consumo). Las siguientes preguntas se pueden considerar para determinar si una zonificación o un monitoreo ambiental resulta útil en una instalación:

1. ¿La formulación del producto tiene una propiedad intrínseca que mataría al patógeno ambiental en cuestión?

Si una propiedad intrínseca elimina patógenos ambientales (por ejemplo, los altos niveles de acidez que presentan las salsas a base de vinagre), puede que la situación no amerite la implementación de un monitoreo ambiental. Se necesitará validar (Procedimientos de verificación y validación) la efectividad de dichas propiedades intrínsecas para asegurar que efectivamente controlan el patógeno.

2. ¿El producto o ingrediente está asociado con la contaminación por patógenos?

La posibilidad de que un patógeno se establezca en el entorno de procesamiento aumenta cuando un ingrediente tiene antecedentes de contaminación por patógenos. *Salmonella spp* tiene antecedentes de haber causado contaminación ambiental en alimentos de baja humedad como cereales, maní, frutos secos y mantequillas de frutos secos, especias, hierbas secas, leche en polvo y chocolate. *Listeria monocytogenes* suele asociarse con brotes en alimentos listos para el consumo, especialmente en aquellos que son refrigerados.

3. ¿El producto recibe un control de procesos validado, diseñado para eliminar patógenos ambientales?

Un control de procesos validado, tal como la cocción, reduce el riesgo.

4. ¿El producto está expuesto al ambiente luego del paso de destrucción de microorganismos y antes de ser envasado?

Si el producto no envasado queda expuesto luego de la cocción, aumenta el riesgo de recontaminación. El manejo de los alimentos listos para el consumo expuestos debe realizarse en entornos con normas de higiene más estrictas, con un monitoreo ambiental periódico que verifique que los controles de higiene son adecuados para minimizar la posibilidad de que se produzca una recontaminación del producto con patógenos ambientales.

5. ¿Se utilizan ingredientes listos para el consumo para producir alimentos listos para el consumo?

En algunos casos no existe un paso de destrucción de microorganismos cuando se combinan ingredientes listos para consumir con el fin de producir alimentos listos para consumir. Del mismo modo que con los productos expuestos al ambiente luego del paso de destrucción, un mayor control de la higiene es necesario para reducir el riesgo de contaminación con patógenos ambientales.

6. ¿Un producto refrigerado listo para el consumo propicia el desarrollo de *Listeria monocytogenes?*

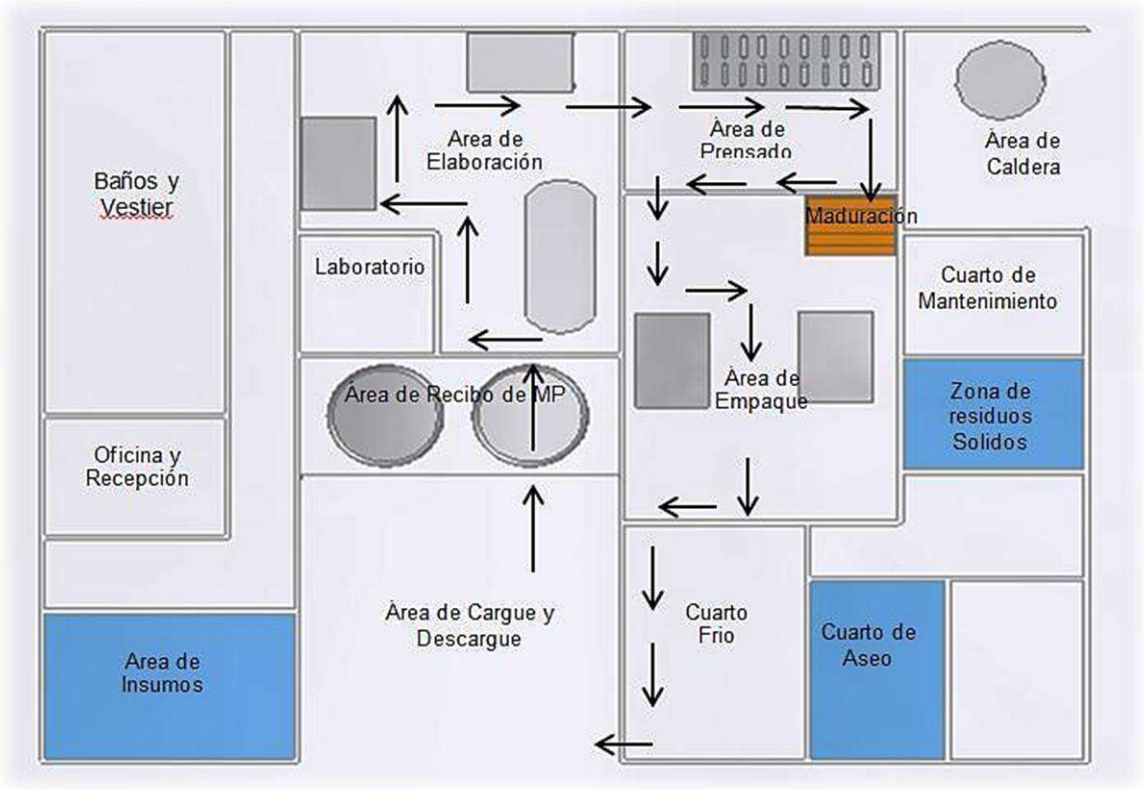
Por lo general los brotes de L. monocytogenes afectan a aquellos alimentos que propician la proliferación del organismo. Las medidas sanitarias que reducen su incidencia en el ambiente son esenciales para evitar la contaminación ambiental de estos productos.

El monitoreo ambiental se utiliza para verificar que las medidas de saneamiento sean adecuadas para mantener un ambiente que no contribuya de manera significativa a la contaminación del producto. Muchos establecimientos realizan pruebas de *Listeria spp*. como indicador de *L. monocytogenes*. Resulta útil definir los requerimientos de higiene de cada área con base en el riesgo de contaminación del producto. En este sentido, es importante identificar:

- Las áreas donde no se elaboran alimentos, incluidas las de mantenimiento, oficinas y zonas para empleados como los comedores. Estas áreas deben cumplir con requerimientos sanitarios básicos, pero no con las BPM. Sin embargo, los individuos que trabajan en estas áreas deben comprender que en otras zonas de las instalaciones se aplican requerimientos sanitarios más estrictos y que deben cumplir con dichos requerimientos cuando ingresan a ellas.
- Las áreas de transición, que pueden incluir una entrada (o puerta), vestuarios o áreas similares que dan paso a áreas básicas de BPM. Las batas, las redecillas, el calzado y otro equipo personal exigido para ingresar a las áreas de BPM deben estar disponibles en las áreas de transición. Se deberá colocar una lista de requisitos para el ingreso y se debe considerar la colocación de estaciones para el lavado de manos, el lavado de pies con espuma, etc., según corresponda para evitar la contaminación de las instalaciones.
- Las áreas básicas de BPM, que incluyen las áreas de recepción y almacenamiento de productos crudos y las de procesamiento general de alimentos, deben mantenerse limpias para que cumplan con los requisitos básicos de las BPM. Es necesario separar las áreas y las herramientas empleadas en la manipulación de ingredientes crudos de aquellas utilizadas para manipular productos cocidos o pasteurizados, a fin de evitar la contaminación cruzada. Esto incluye la implementación de un sistema de flujo y tráfico lineal del producto, ya sea a pie, en carretilla, autoelevadora u otros medios, para evitar la contaminación cruzada. Si una instalación tiene áreas de contacto cruzado que no pueden separarse por problemas de diseño, se deberá prestar especial atención a los controles preventivos para evitar una contaminación cruzada accidental.
- Las áreas de control de patógenos primarios son aquellas en las que los productos cocidos, pasteurizados o listos para el consumo se ven expuestos al ambiente, como áreas de envasado de dichos productos. En estas áreas se deberán aplicar medidas sanitarias más estrictas para minimizar la posibilidad de contaminación cruzada. El control de acceso del personal (por ejemplo, mediante uniformes identificados por color, calzado especial, etc.) y equipo específicamente dedicado como carretillas o autoelevadoras también puede resultar útil para evitar que los contaminantes ambientales realicen ''autostop'' y lleguen a un espacio más sensible.
- Las áreas sensibles/de alto nivel de higiene, incluyen áreas que producen alimentos para poblaciones sensibles, como los lactantes, y alimentos utilizados en contextos clínicos.

Resulta útil colocar en un lugar visible un mapa de las instalaciones codificado por color, para diferenciar las zonas higiénicas y mostrar los flujos de tráfico correctos, a fin de fortalecer la zonificación y el cumplimiento. Un mapa con estas características puede utilizarse para orientar a los nuevos empleados y los visitantes y recordarle a todos la necesidad de minimizar la contaminación cruzada.

Se deben implementar controles para el acceso y el ingreso a áreas de procesamiento con higiene controlada, definir y establecer como obligatorio el uso de indumentaria adecuada para cada área de la instalación y determinar quién puede ir dónde y los requisitos para el ingreso. Por ejemplo, ¿deben utilizar mascarillas para ingresar a áreas sensibles? ¿O bien calzado especial? Un área de transición ideal cuenta con carteles y barreras físicas que llevan a la aplicación de los requerimientos adecuados, tales como torniquetes, duchas de aire y estaciones de lavado de manos en el ingreso que no pueden ser obviados. Las imágenes en los carteles son los métodos más eficaces.



Los objetivos principales del monitoreo ambiental son verificar y confirmar la eficacia de los controles sanitarios y de zonificación y llevar a cabo actividades que mejoren los controles. El monitoreo ambiental resulta útil cuando el ambiente debe ser controlado para prevenir la contaminación microbiana y siempre que la realización de pruebas sea beneficiosa para verificar el control del patógeno en cuestión. Un programa eficiente de monitoreo ambiental realiza un intento diligente de encontrar el patógeno indicador en cuestión, de modo tal que las correcciones pueden realizarse antes de que el producto se vea afectado y de que se pueda evaluar la eficacia de las intervenciones. Por ejemplo, un programa sólido de monitoreo ambiental puede ayudar a detectar la presencia de patógenos de nicho y a diferenciarlos de las cepas transitorias.

Esto sirve para determinar cómo se debe reaccionar ante su detección. Es esencial implementar una cultura que aplique una política permanente de ‘’buscar y destruir’’ aplicada al monitoreo ambiental. Un programa de monitoreo ambiental debe diseñarse específicamente para las instalaciones y debe considerar los productos que allí se elaboran, los ingredientes utilizados, cualquier antecedente de patógenos ambientales y otros factores relevantes.

La toma de muestras es sesgada, lo que significa que los sitios de obtención de muestra son los casos más problemáticos y que se trata de identificar áreas con dificultades y no de implementar un programa aleatorio de toma de muestras dirigido a identificar la situación ''promedio''. Esto puede parecer riesgoso al principio, y algunos podrán cuestionarlo diciendo ''¿por qué debo intentar encontrar un patógeno ambiental en mi establecimiento?''. La respuesta es: porque usted tiene más posibilidades de encontrar un patógeno potencial en el ambiente antes de hallarlo en el producto, lo que puede evitar un retiro del mercado de amplio alcance o, lo que es peor, un brote.

Investigaciones sobre varios casos de brotes indican que el ambiente de las instalaciones fue la fuente de las cepas involucradas en ellos. *Salmonella* sobrevive muy bien en ambientes secos. Cuando se introduce agua en el alimento y hay disponibilidad de nutrientes (por ejemplo, alimentos en polvo), puede multiplicarse, aumentando así las posibilidades de que sea transportada a otra área por el movimiento de humedad o por la contaminación de un objeto móvil o de una persona. Los brotes de *Salmonella* en los que se sospecha la intervención de la contaminación ambiental se han asociado con ciertos productos alimenticios secos, como mezclas para preparar productos panificados, mantequilla de maní, frutos secos y cereales de desayuno. Es por esto que muchas veces es necesario realizar monitoreos ambientales para detectar posibles casos de *Salmonella* en numerosos entornos de procesamiento de alimentos listos para el consumo y de baja humedad.

Los brotes de *Listeria monocytogenes* se asocian con productos refrigerados listos para el consumo, por lo que se requieren frecuentes monitoreos ambientales para detectar una posible recontaminación. El monitoreo de *Listeria spp* se utiliza como prueba más general en algunos establecimientos, ya que resulta más fácil detectar un posible problema. Sin embargo, analizar el ambiente para detectar la presencia de *L. monocytogenes* puede resultar adecuado en algunas instalaciones. La decisión debe tomarse consultando a un microbiólogo alimentario calificado que comprenda la ecología microbiana del tipo de establecimiento en cuestión. Teniendo en cuenta que el objetivo del monitoreo ambiental es detectar posibles fuentes de contaminación, la toma de muestras suele enfocarse en áreas de mayor riesgo. Se tomarán muestras más seguido en las áreas de control de patógenos primarios. No es frecuente la toma de muestras en áreas donde no se elaboran alimentos.

Dentro de cada área se utiliza el término **zonas** para la ubicación exacta de la toma de muestras. La **zona 1** representa las superficies de contacto con alimentos, tales como contenedores, cintas transportadoras, utensilios e incluso las manos que tienen contacto directo con el alimento.
La **zona 2** incluye áreas adyacentes a las superficies de contacto con alimentos y se les suele llamar superficies de contacto indirecto con los productos. Algunos ejemplos son los soportes, los paneles del equipo o los delantales.
La **zona 3** incluye todos los otros elementos dentro del área de producción o procesamiento -pisos, paredes, techos, rejillas y otros equipos.
La **zona 4** abarca el resto de las áreas de las instalaciones no dedicadas a la producción, como pasillos, talleres de mantenimiento y áreas de recreación de los empleados.

Las mejores prácticas indican que el monitoreo debe concentrarse en las zonas 2, 3 y 4. Dado que suelen contaminarse más a menudo, el muestreo en estas zonas aumenta las probabilidades de detectar una posible fuente de contaminación antes de que sea hallada en el producto. La detección y la corrección tempranas ayudan a evitar la contaminación de superficies/áreas de contacto con el producto (zona 1). La toma de muestras en la zona 1 es poco frecuente, pero de realizarse, se deberá retener el producto hasta asegurarse de que los resultados son negativos, para evitar un posible retiro del mercado. El personal debe recibir capacitación para realizar la toma de muestras ambientales y utilizar su criterio para decidir cuándo tomar medidas diferentes del plan original con base en observaciones o acontecimientos especiales. Con las herramientas correctas se pueden tomar muestras en rajaduras, grietas, áreas elevadas, áreas extensas de piso, rejillas, raspaduras secas y aire. Preparar un mapa de las instalaciones con todas las rejillas demarcadas. Determine una lista de sitios en las instalaciones. Asegúrese de que cada vez se tomen más muestras en las zonas 2 y 3 y algunas de la zona 4. Tome muestras durante la producción, al menos tres horas luego de iniciado el proceso. Las muestras pueden ser compuestas para ahorrar costos, tomando muestras individuales de cada sitio y combinándolas para formar una muestra compuesta. No utilice la misma esponja en múltiples sitios de muestreo, ya que esto puede dispersar una posible contaminación. Aumente la cantidad de muestras tomadas cuando se trata de agua, áreas de refugio de microbios o de mucho tráfico con más probabilidades de constituir una fuente de contaminación debido a las condiciones de infraestructura de la planta y el equipo. La desinfección del sitio luego del muestreo se considera una buena práctica.

La detección de un patógeno en una muestra obtenida en la zona 1 exige tomar medidas inmediatas, ya que pone en duda la inocuidad del producto producido en esa línea. Si esto ocurre, se recomienda consultar con expertos para evaluar los datos recabados con el paso del tiempo, las prácticas de saneamiento y otros factores pertinentes para determinar si se desecha el lote. A fin de monitorear los indicadores se deben establecer los niveles de acción y objetivos luego de determinar las líneas base. Resulta difícil interpretar resultados si no existe una base para la comparación.

Existen instalaciones que fabrican el mismo producto, pero tienen perfiles muy diferentes. Por lo general la recolección de datos de línea base supone una toma de muestras muy frecuente durante un periodo determinado y su fin es capturar una “instantánea” de lo que constituye una operación estable o de rutina. Se pueden recabar datos en tandas para cubrir la variabilidad estacional. De no tomar muestras en todos los sitios cada vez que se realiza la actividad, se puede implementar un sistema de rotación. En vista de que el objetivo del programa es identificar de forma proactiva fuentes potenciales de contaminación, se recomienda tomar muestras en los peores escenarios o condiciones observados, como, por ejemplo, agua estancada, goteras en techos, producto acumulado, etc.

Se puede aumentar la frecuencia del muestreo durante los meses iniciales del programa para lograr una mejor implementación de la norma en las instalaciones, tomando en cuenta factores como estacionalidad, condiciones del tiempo, instalaciones adyacentes y cambios en el personal. Se considera una mejor práctica un enfoque de **tres etapas**: 1) muestreo de rutina (con enfoque en alto riesgo), 2) muestras para investigación y 3) muestreo de seguimiento para confirmar la eficacia de las medidas correctivas. La frecuencia con la que se recaban los datos puede aumentar o disminuir de acuerdo con un análisis de los datos históricos de las instalaciones, la determinación de patrones de tráfico y el riesgo del producto.

El hallazgo de una muestra ambiental positiva es una oportunidad de investigar y ver si algo ha fallado en el programa de control. Tenga en cuenta que algunos resultados positivos son por microbios transitorios y, por ende, no requieren ningún cambio. Por otra parte, algunos resultados positivos exigen tomar medidas para evitar la contaminación del producto. Una buena investigación se logra combinando observación, inspección y muestreo intensivo. Si la muestra positiva era compuesta, entonces vuelva a tomar muestras de toda el área. Estas muestras se analizan individualmente para identificar y aislar el área con problemas. Además de reanalizar, observe el equipo (armado y desarmado), el proceso, el personal y la limpieza y la desinfección para descubrir factores que puedan haber contribuido a la contaminación. También es importante observar el flujo de materiales para determinar si los flujos cruzados constituyen un problema. Partiendo de la investigación, pueden ser necesarios cambios en los procedimientos. En ocasiones las acciones correctivas pueden focalizarse en un nicho de las instalaciones o en equipo que debe ser retirado, reparado o limpiado. Pueden requerirse también nuevos procedimientos y se deberá capacitar al personal con respecto a estos cambios. Una vez realizadas las correcciones necesarias, se deberá realizar una limpieza y una desinfección profundas. Se confirmará luego su eficacia a través de una toma de muestras intensiva y repetida durante un periodo extenso. Tome nuevas muestras cubriendo un amplio espectro luego de la limpieza y la desinfección, durante las operaciones, en los cambios de turno y en periodos inactivos durante un tiempo prolongado.

Si luego de un evento se obtienen numerosas muestras positivas, la medida correctiva no está funcionando de forma eficaz. Esto puede deberse a la presencia de un refugio o nicho que no fue descubierto o eliminado. Revise toda la instalación, el equipo y los controles operativos para asegurarse de que se han tomado todas las medidas a su alcance. Algunas instalaciones han tenido que detener la producción en ciertas áreas por nichos ambientales que no han podido ser eliminados. Goteras en el techo, atascos en las rejillas del suelo en áreas de producto expuesto, la construcción o instalación de equipos y la transición entre áreas de construcción y producción pueden aumentar la prevalencia de patógenos ambientales. Deben implementarse procedimientos para proteger las áreas de procesamiento y al producto durante este tipo de eventos. En situaciones relacionadas con goteras o ingreso de agua en entornos secos se recomienda el monitoreo ambiental para detectar la posible presencia de *Salmonella*. Es útil tomar estas muestras inmediatamente después de limpiar, ya que este representa probablemente el peor de los escenarios. Si no se detecta *Salmonella* en estas muestras, puede que el ambiente no se vea afectado.

Sin embargo, si se detecta el organismo, se deberán tomar acciones inmediatas para desinfectar el área sin utilizar agua de forma extensiva, ya que de lo contrario podría empeorar la situación. Durante periodos de construcción deben evaluarse los patrones de tráfico para minimizar posibles fuentes de contaminación. El polvo y el tráfico deben controlarse en caso de construcción. Al finalizar las actividades de construcción, el área deberá limpiarse y desinfectarse y se deberán tomar muestras antes de retomar la producción. Para verificar el restablecimiento de los controles, se deben realizar monitoreos ambientales adicionales luego de estos eventos. Se considera una mejor práctica el control y la elaboración de tendencias de monitoreo ambiental. El formato de los informes de resultados tendrá un impacto sobre la información provista. Si usted se toma el trabajo de recabar datos de monitoreos ambientales, asegúrese de maximizar el valor de la información, a fin de poder utilizarla para proteger su producto y sus instalaciones. Los resultados presentados en un formato práctico maximizan el valor de los datos. Por ejemplo, una hoja de cálculo puede ayudar a identificar tendencias de monitoreos de rutina o intensivos. Un mapeo de las instalaciones también puede ser utilizado para mostrar la ubicación de los positivos y determinar si se ubican en el mismo lugar, lo que podría indicar un nicho ambiental. Los resultados colocados en un mapa pueden utilizarse para demostrar la efectividad de los controles preventivos para patógenos ambientales.

Recuerde, los análisis no son un ''control''; los resultados positivos también pueden ser buenos ya que uno puede tomar medidas antes de que se detecte el patógeno en un producto. Los programas de monitoreo ambiental deben analizarse y actualizarse al menos una vez al año. Si se cuenta con un programa sólido, las modificaciones se realizan cuando así se requiera, por ejemplo, cuando resultan de las medidas correctivas y cuando se producen cambios en los ingredientes, los procesos o el equipo. Si nunca se obtienen resultados positivos y esto no es lo esperable, ello puede significar que el programa no está siendo gestionado con una actitud proactiva de buscar y destruir. Cualquier auditor experimentado se mostrará escéptico ante un programa de monitoreo ambiental que nunca muestra resultados positivos en el largo plazo. El hallazgo de una muestra ambiental positiva es una oportunidad de investigar y determinar si algo ha fallado en el programa de control. Una buena investigación se logra combinando observación, inspección y muestreo intensivo.

Se recomienda observar el equipo (armado y desarmado), el proceso, el personal, la limpieza y desinfección para descubrir factores que puedan haber contribuido a la contaminación. También es importante observar el flujo de materiales para determinar si los flujos cruzados constituyen un problema. Partiendo de la investigación pueden ser necesarios cambios en los procedimientos. Las acciones correctivas pueden focalizarse en un equipo que deber ser retirado, reparado o limpiado.

Pueden requerirse nuevos procedimientos y se deberá capacitar al personal respecto a estos cambios. Una vez realizadas las correcciones necesarias, se deberá hacer una limpieza y una desinfección profundas. Se confirmará su eficacia a través de una toma de muestra intensiva y repetida durante un periodo extenso.

Descripción de la frecuencia de muestreo para las diferentes alternativas de plantas de procesamiento de alimentos clasificadas por la USDA FSIS

Alternativas del USDA FSIS	Descripciónde las alternativas	Tamaño de la clasificación del HACCP	Volumen de producción/ día (libras)	Frecuencia mínima de las pruebas de superficie de contacto con alimentos (nota: se deben recolectar3 a 5 muestras por línea)
Alternativa 1 (Alt. 1)	PLT y AMAP	n/a	n/a	2 veces/ año/ línea(cada 6 meses)
Alternativa 2, Opción 1 (Alt. 2a)	Solo PLT	n/a	n/a	4 veces/ año/ línea (trimestral)
Alternativa 2, Opción 2 (Alt. 2b)	Solo AMAP	n/a	n/a	4 veces/ año/ línea (trimestral)
Alternativa 3 (Alt. 3); ni fiambres o carnes frías ni salchichas para hotdogs	Solo saneamiento(ni PLT ni AMAP)	n/a	n/a	1 vez/ mes/ línea (mensual)
Alternativa 3 (Alt. 3); fiambreso hotdogs	Solo saneamiento(ni PLT ni AMAP)	Muy pequeño	1 – 6,000	1 vez/ mes/ línea (mensual)
		Pequeño	6,001 – 50,000	2 veces/mes/línea (cada 2 semanas)
		Grande	50,001 - >600,000	4 veces/ mes/ línea (semanal)

Leyenda de la figura: Tratamiento luego de un proceso letal (PLT, Post-lethality treatment): proceso que se utiliza para reducir o eliminar a L. monocytogenes en el producto; entre los ejemplos se incluyen la pasteurización y el procesamiento a alta presión. Agente o proceso antimicrobiano (AMAP, Antimicrobial agent or process): agente o proceso que se utiliza para limitar o suprimir la proliferación de L. monocytogenes en el producto.

10. Salmonella y Listeria

Todas las fases de la producción alimentaria están de alguna manera afectadas por el control de patógenos, desde la planta de fabricación hasta los supermercados y tiendas de alimentación. Las medidas de control de patógenos hacen hincapié en todas las áreas de fabricación y se recogen en el APPCC. Existen muchos microorganismos, cuya ingestión puede causar enfermedades en los consumidores. Los síntomas de la intoxicación alimentaria pueden variar mucho dependiendo de la cantidad ingerida, la cepa del organismo, y el estado de salud o edad del consumidor. Dos de los más conocidos responsables de la retirada de productos y enfermedades de transmisión alimentaria son las cepas patogénicas de *Listeria spp y Salmonella spp. Listeria monocytogenes* es la única especie conocida del género Listeria que es un patógeno de alimentos. Es un psicrótrofo y puede sobrevivir y crecer a temperaturas de refrigeración tan bajas como -0,4 ºC. El rango de crecimiento para este organismo es -0,4 a 45 ºC, dentro de un intervalo de pH de 4 a 9, y es un halófilo, lo que significa que es extremadamente tolerante a la sal. Aunque es el único patógeno conocido, otras especies de *Listeria* también se pueden encontrar en los alimentos y el entorno productivo.

A menudo la presencia de especies no patógenas se considera una indicación de limpieza insuficiente y muchos fabricantes tratan la detección de estas especies como si de Listeria monocytogenes se tratara. Es referida a menudo como el organismo de “plantas limpias” porque no se trata de un competidor resistente si otros microorganismos están presentes. Una vez que este organismo se instala en la planta suele ser difícil de erradicar. A diferencia de Listeria, hay varias especies de *Salmonella* que se sabe, causan enfermedades transmitidas por alimentos. Dos de las especies más comunes son *S. typhimurium y S. enteritidis.* La tasa de crecimiento óptimo para este organismo es de 5 a 45 ºC, con un intervalo de pH de 4 a 9. Aunque no tiene la capacidad de crecer y reproducirse en productos alimenticios secos, tiene la capacidad de sobrevivir durante largos períodos de tiempo.

La contaminación por *Salmonella* es un problema en los productos que contengan huevo crudo. Los fabricantes de ovoproductos deben indicar la presencia de huevo crudo o productos a base de huevo tanto para control de alérgenos como de seguridad alimentaria. Aislar la fabricación de productos que contienen huevos crudos es una práctica común que se realiza para reducir la posibilidad de contaminación cruzada de *Salmonella* y alérgenos. Los productos que contienen huevo crudo, ya sea líquido, seco o congelado, tienen advertencias para cocinar el producto a fondo para evitar posibles enfermedades. En el entorno de fabricación, las especies de *Salmonella* son conocidas por ser menos susceptibles a los productos basados en amonios cuaternarios y se eliminan más fácilmente con productos clorados o halógenos.

Las toxiinfecciones alimentarias provocadas por los microorganismos patógenos del género *Salmonella* y *Listeria* tienen una gran importancia en los países desarrollados por el gran número de personas infectadas y por la industrialización en la producción de alimentos que favorece la diseminación de estos patógenos. Hemos de tener en cuenta que la listeriosis humana afecta principalmente a las personas adultas de más de sesenta años, a las mujeres embarazadas, a los niños recién nacidos y también a todas aquellas personas que tienen comprometido su sistema inmunitario. Por todo ello, en las personas susceptibles de padecer esta enfermedad la mortalidad es elevada; así, estudios recientes han demostrado que esta enfermedad tiene una incidencia de aproximadamente 5 casos por millón de personas. Por lo que se refiere a la incidencia de las bacterias del género *Listeria* en las aves de corral y, más concretamente en los pavos, estudios recientes han demostrado que entre un 23 a un 60% de las canales de las aves de corral en Estados Unidos y en Inglaterra son positivas a la bacteria patógena *L. monocytogenes*. La salmonelosis es una enfermedad de origen alimentario que afecta a un gran número de personas y sus vehículos de transmisión son tan amplios que se la considera una de las más importantes toxiinfecciones alimentarias mundiales. La importancia de esta enfermedad radica tanto en la elevada morbilidad entre las personas como por los elevados costos que provoca en la sanidad pública, además de los generados por las pérdidas de producción animal y el aumento de los costes de producción en los corrales infectados. En la actualidad se llega a 4,8 millones de casos anuales constatados, todos ellos relacionados directamente con aves de corral infectadas con las bacterias del género *Salmonella*. La prevalencia de salmonela en los productos derivados de aves de corral es muy variable, desde un 2 a un 100%.

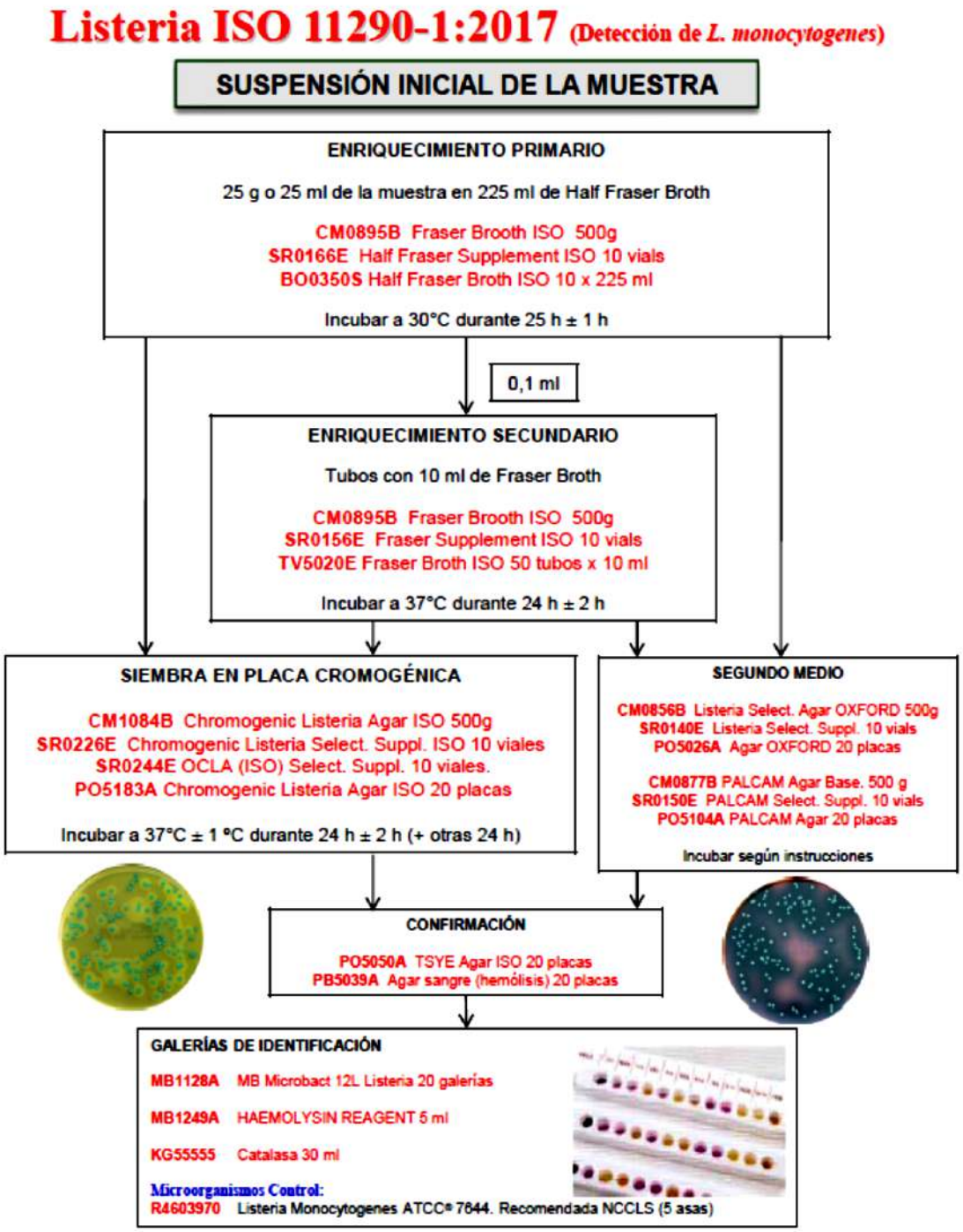
Listeria spp

El género *Listeria* spp recibe su nombre en honor del cirujano británico Joseph Lister y la especie *L. monocytogenes* por el síndrome de monocitosis presente en determinados enfermos de listeriosis. El mayor brote epidémico de listeriosis en humanos descrito en Alemania entre los años 1949 y 1951 se relacionó directamente con el consumo de leche cruda y al menos desde 1980 los cinco mayores brotes epidémicos de listeriosis humana asociados a los alimentos se han concentrado principalmente en las áreas geográficas de Europa y América del Norte, de los cuales los más destacados fueron en 1981, en Canadá; en 1983 en Massachusetts (E.E.U.U.); en 1985 en Los Ángeles y California (E.E.U.U.) ; entre 1985 y 1987 en Suiza; y en 1992 en Francia. Son bacilos de forma regular y con forma de vara corta, algunas veces pueden tener forma cocoide, apareciendo como células individuales o bien en cadenas cortas.

Pueden ser móviles cuando se cultivan a temperaturas de 20 a 25ºC y esta movilidad está provocada por la presencia de tres o cuatro flagelos de implantación periférica. La morfología de las colonias que han crecido en medios nutritivos sólidos (agar) a las 24-48 horas son de un tamaño de 0,5-1,5 mm de diámetro, redondas, translúcidas con apariencia de gota de rocío, ligeramente convexas con la superficie fina y el margen entero. Son microorganismos Gram positivos que tienen un metabolismo aeróbico y anaerobio facultativo. Los carbohidratos son esenciales para el crecimiento, siendo la glucosa el carbohidrato de elección. La adición de glucosa en un medio de cultivo de enriquecimiento es esencial para obtener crecimientos óptimos del microorganismo.

La **Norma ISO 11290:2018** es la base para la detección y recuento de *Listeria spp y Listeria monocytogenes.*

- Enriquecimiento primario en caldo Half-Fraser: incubación durante 25 h ± 1 h
- Enriquecimiento secundario en caldo Fraser: incubación durante 24 h ± 2 h
- Los caldos Half-Fraser y Fraser pueden ser refrigerados un máximo de 72 h antes del aislamiento en agar selectivo
- Almacenamiento de las placas de aislamiento: las placas incubadas pueden ser refrigeradas un máximo de dos días antes de la lectura
- El aspecto microscópico para la confirmación es opcional si el aislamiento en agar permite distinguir entre Listeria spp patógenas y no patógenas
- La prueba CAMP y la prueba de la catalasa son opcionales
- La suspensión primaria se puede preparar con Agua de Peptona Tamponada, Caldo Half Fraser con o sin suplementos, y todos los diluyentes adecuados que establece la ISO 6887 (todas las partes)
- La etapa de revivificación ha sido eliminada
- El aspecto microscópico, la prueba de la catalasa y la prueba CAMP para confirmación son opcionales



Podríamos decir, por lo tanto, que es ubicua en la naturaleza. Las diferentes especies, se pueden aislar regularmente del suelo y de las plantas, dando un resultado positivo a la identificación de *L. monocytogenes* que puede variar desde el 9% hasta el 44%. La contaminación de los vegetales se produce en el campo, el almacenamiento prolongado en frío de los vegetales y la ausencia de cocinado de los mismos hace que la ingestión de estos productos contaminados produzca una colonización del tracto gastrointestinal de las personas más susceptibles. La práctica habitual de conservar en frío durante cierto tiempo a los vegetales después de su distribución por los mayoristas, puede permitir que un inoculo inicial pequeño prolifere, o bien que el frío cause la muerte de los microorganismos competitivos favoreciendo su crecimiento.

En el caso de la leche, la contaminación se produce durante el ordeño, los brotes epidémicos ocasionados por *L. monocytogenes* se han asociado al consumo de productos lácteos como quesos curados tradicionales, quesos blandos, quesos de tipo Cheddar y en quesos de tipo Camembert. Se han encontrado en Dinamarca, a fines de 1998, incidencias del 44% de *L. monocytogenes* y del 22 % de *Listeria* spp. en muestras de salmón ahumado envasado al vacío y conservado en refrigeración adquiridas en supermercados, así como muestras de carne picada de vacuno que estaban contaminadas con un 28% de *L. monocytogenes.*

La prevalencia de *Listeria spp* en tres puntos distintos del proceso de carnización del pavo (inmediatamente después del enfriamiento, después del envasado y a nivel del despiece) fue de un 4,4%, 13,3% y 23,3%, en estudios de 1997; la prevalencia en las manos y los guantes de los manipuladores de alimentos derivados del pavo tras las fases del enfriado, en el proceso de despiece de canales y en el envasado de las piezas fue del 16,7%, 33,3% y 40,0%; las canales de pollo se contaminan mayoritariamente a través de las superficies, de los utensilios, del equipo de procesado y debido a la contaminación cruzada y se han aislado en el 50% de las canales de pollo preparadas para cocinar antes de ser envasadas siendo las piezas del pollo más contaminadas, la carne de las patas y la piel, con un 96% de muestras que contenían *Listeria* spp. Las patas del pollo fueron encontradas como las partes más contaminadas en comparación con las alas y las pechugas. Estos resultados sugieren que la carne de las patas y la piel son los responsables de la mayoría de las canales de pollo contaminadas, y que cualquier superficie que entre en contacto con estas piezas puede jugar un papel importante en la distribución del patógeno.

La presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos precocinados (“ready-to-cook”) obtenidos a partir de pollo crudo tiene su origen en las aves que excretan el microorganismo por vía fecal, provocando una contaminación de las canales durante el proceso de evisceración. La contaminación de la carne constituye un riesgo de contaminación cruzada con otros alimentos ya que también se puede encontrar en las superficies húmedas de las plantas procesadoras de alimentos que constituyen reservorios que, combinado con la habilidad de esta bacteria para crecer a temperaturas bajas, da lugar a una elevada presencia en los refrigeradores y en las unidades de frío. Las superficies de los utensilios y los equipos en contacto con el producto en las fases finales del proceso de carnización tienen una gran importancia como fuentes de contaminación durante todo el proceso de transformación de los productos.

En las industrias alimentarias las listerias se encuentran de mayor a menor frecuencia en zonas húmedas, suelos, lavamanos, residuos alimentarios y superficies de contacto con los alimentos. Estos resultados demuestran que las condiciones de sequedad y la restricción de residuos alimentarios contribuye al control de estos microorganismos, pero sobrevive bien en gran variedad de ambientes y en particular en aquellos que son húmedos y con material orgánico deteriorado. Esto, junto con la tolerancia a los agentes conservantes más comunes, tales como el ClNa y el nitrito, y la habilidad de crecer en una amplia gama de alimentos a temperaturas de refrigeración, hace de *L. monocytogenes* un potente microorganismo contaminante durante el procesado de los alimentos.

La contaminación y la supervivencia en los alimentos crudos durante el proceso de producción es debido a la tolerancia de la bacteria a las condiciones adversas incluyendo la temperatura, el pH extremo y la presencia de conservantes alimentarios, siendo las principales vías de transmisión, el contacto directo del hombre con el animal infectado, la infección cruzada durante el periodo neonatal, y la transmisión alimentaria. El periodo de incubación (en la mayoría de los casos es corto): 1 o 2 días en las lesiones cutáneas, de 5 a 12 días en las infecciones neonatales, y 1 día en los casos de infección alimentaria asociada al consumo de queso blando. Se ha demostrado que en la infección alimentaria el periodo de incubación en algunos individuos es relativamente largo, cercano a los 90 días. No se sabe el porqué de estas diferencias en el período de incubación, pero en el caso de la ingestión oral depende del número de células o de la cepa. La dosis infectiva en las epidemias de listeriosis es alta, superior a 10^3 ufc/g, y puede variar en función de los individuos y de su estado inmunológico. La listeriosis se ha reconocido durante la última década como una toxiinfección alimentaria emergente. El número de brotes de listeriosis es bajo en comparación con los alimentos contaminados con *Salmonella* o con *Campylobacter.*

La listeriosis humana más frecuente afecta a las mujeres embarazadas, neonatos y pacientes inmunodeprimidos, afectando al sistema nervioso central y distribuyéndose a través del torrente sanguíneo. En las mujeres no embarazadas y en los individuos sanos puede cursar de forma subclínica o bien, con más frecuencia, con meningitis o septicemia. Los síntomas de la infección en los casos perinatales cursan generalmente con fiebre suave en la madre, con o sin gastroenteritis débil, o con síntomas de gripe; pero las consecuencias para el feto o el neonato son mucho mayores e incluso fatales. El feto presenta una infección septicémica generalizada que provoca, en la mayoría de los casos, la muerte intrauterina durante el primer trimestre del embarazo. En infecciones posteriores puede que el niño nazca prematuramente y seriamente enfermo. La septicemia es lo más común en estos casos y, a veces, va acompañada de meningitis. En listeriosis tardías, alrededor de los diez días después del nacimiento, normalmente cursa con meningitis.

La temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias está entre 30ºC y 37ºC, aunque los límites de temperatura en los cuales puede crecer o sobrevivir van desde 0,4ºC a 45ºC. Así, esta bacteria no sobrevive a temperaturas de 60ºC durante 30 minutos, pero puede sobrevivir durante bastantes semanas a –18ºC en diferentes substratos alimentarios. La capacidad de sobrevivir a la congelación y al almacenamiento a temperaturas inferiores a –18ºC en carnes picadas, depende de la acidez del alimento, es decir, del pH. El daño que producen las bajas temperaturas a la bacteria se da, en la mayoría de los casos, durante las primeras 24 horas de congelación y este daño permanece constante o bien se incrementa durante los 14 días siguientes.

El daño producido por las temperaturas de congelación puede ser reversible en todas las cepas si se utilizan caldos reparadores para su recuperación, tales como el caldo TSB y/o LRB. Aunque el daño celular hace perder capacidad infectiva a la bacteria, ésta puede recuperar su capacidad de multiplicación si está sometida a condiciones favorables para su crecimiento. Un tratamiento eficaz sería aquel que destruyese la máxima cantidad de células de la cepa más termorresistente.

Así pues, un tratamiento térmico a 72ºC durante 15 segundos en la leche (o bien un tratamiento equivalente) destruye el 99,99% de la población de *Listeria,* aunque esta sea aproximadamente cuatro veces más resistente al calor que *Salmonella* en las carnes picadas. Generalmente, es más tolerante al calor en la carne que en la leche o en el huevo. En carnes contaminadas naturalmente es, aproximadamente, de dos a cuatro veces más sensible al calor que en carnes contaminadas experimentalmente. También es más resistente que muchos otros patógenos a los efectos de los ácidos en combinación con el calor. Los valores de pH en los que el crecimiento de las listerias está favorecido se encuentran entre valores ligeramente alcalinos a neutros. Así, el intervalo óptimo estaría entre 6 y 9.

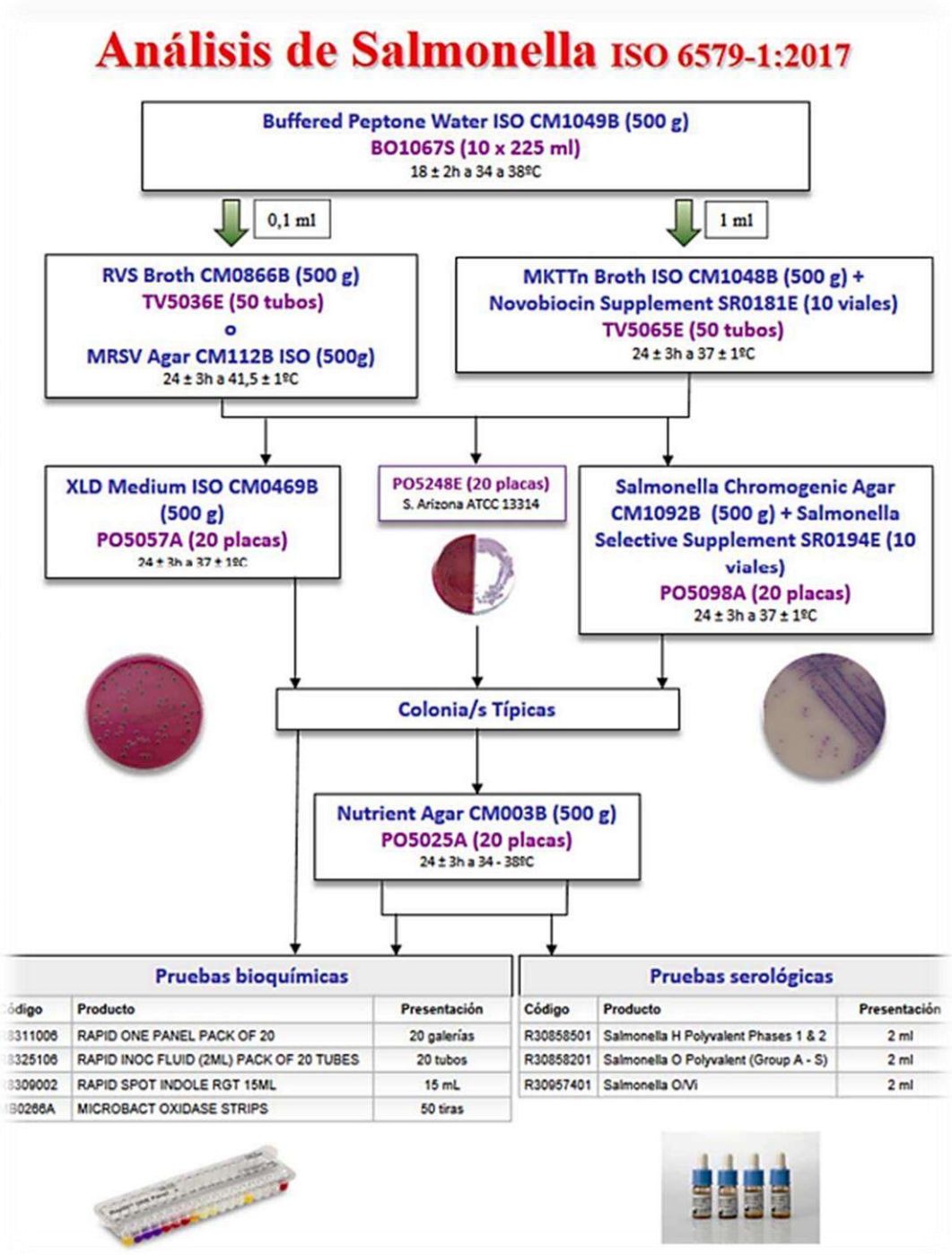
Bajas concentraciones de sal (de 4% a 6%) aumentan la supervivencia de la bacteria, y concentraciones superiores al 6% la reducen. los ácidos orgánicos son, generalmente, más inhibidores del microorganismo que los ácidos inorgánicos debido a su naturaleza lipofílica. La efectividad de los ácidos débiles, como los desinfectantes de las superficies y como los conservantes de los alimentos, está influenciada por el pH, mientras que el límite de los valores de actividad de agua (aW) que afectan al crecimiento de las bacterias, es de aproximadamente 0,90 a 30ºC. La principal característica de las altas presiones es la de ser un proceso no térmico capaz de destruir a los microorganismos sin que haya una alteración de las características organolépticas y nutricionales de los alimentos, y de proporcionar salubridad y durabilidad a los mismos. Sin embargo, este proceso tiene algunas desventajas. A altas presiones el proceso puede no ser económico para su uso comercial debido al alto costo de los equipos y al incremento de fatiga de los elementos metálicos de las instalaciones. Además, la textura y el color de algunos alimentos pueden ser alterados y algunas esporas de bacterias pueden ser resistentes a este proceso, aunque en el caso de *Listeria spp, se ha detectado que:*

- La viabilidad de las células disminuye con el incremento de la presión y el tiempo.
- Por encima de 200 Mpa (milipascales), hay muerte celular.
- Los datos de mortalidad celular por encima de 275 Mpa son importantes.
- Las bacterias Gram negativas tienen mayor sensibilidad que las bacterias Gram positivas, y en ambos grupos hay diferente sensibilidad a la presión según las especies y/o cepas que se traten.
- La viabilidad de este proceso es menor en un alimento que en un tampón de fosfato.

SALMONELLA spp

El nombre del género fue acuñado por Lignières en el año 1900 en honor a los trabajos realizados por el Dr Salmon, bacteriólogo americano que caracterizó los bacilos causantes del cólera del cerdo. La primera vez que un laboratorio confirmó un brote de toxiinfección alimentaria provocado por salmonelosis, se vieron implicados 57 personas que comieron carne de un animal enfermo. *Salmonella enteritidis* fue aislada de los órganos de una de las personas fallecidas y de la carne y la sangre del animal (ICMSF, 1996). Desde entonces la salmonela ha sido reconocida como la mayor causante de fiebres entéricas y gastroenteritis.

Salmonella es un género de la familia de las Enterobacterias. Los miembros de esta familia se caracterizan por ser Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, bacterias con forma de barra y con las puntas redondeadas. Las formas móviles tienen flagelos de implantación periférica. *Salmonella* es normalmente móvil y aerógena, en la mayoría de sus cepas; producen ácido y a veces gas a partir de la glucosa, raramente fermentan la lactosa o la sacarosa. La mayoría de los miembros de esta familia se encuentran en el tracto intestinal de los humanos y de los animales ya sea como patógenos o como comensales y posee una gran variedad de serovares, géneros y subgéneros (más de 2200).

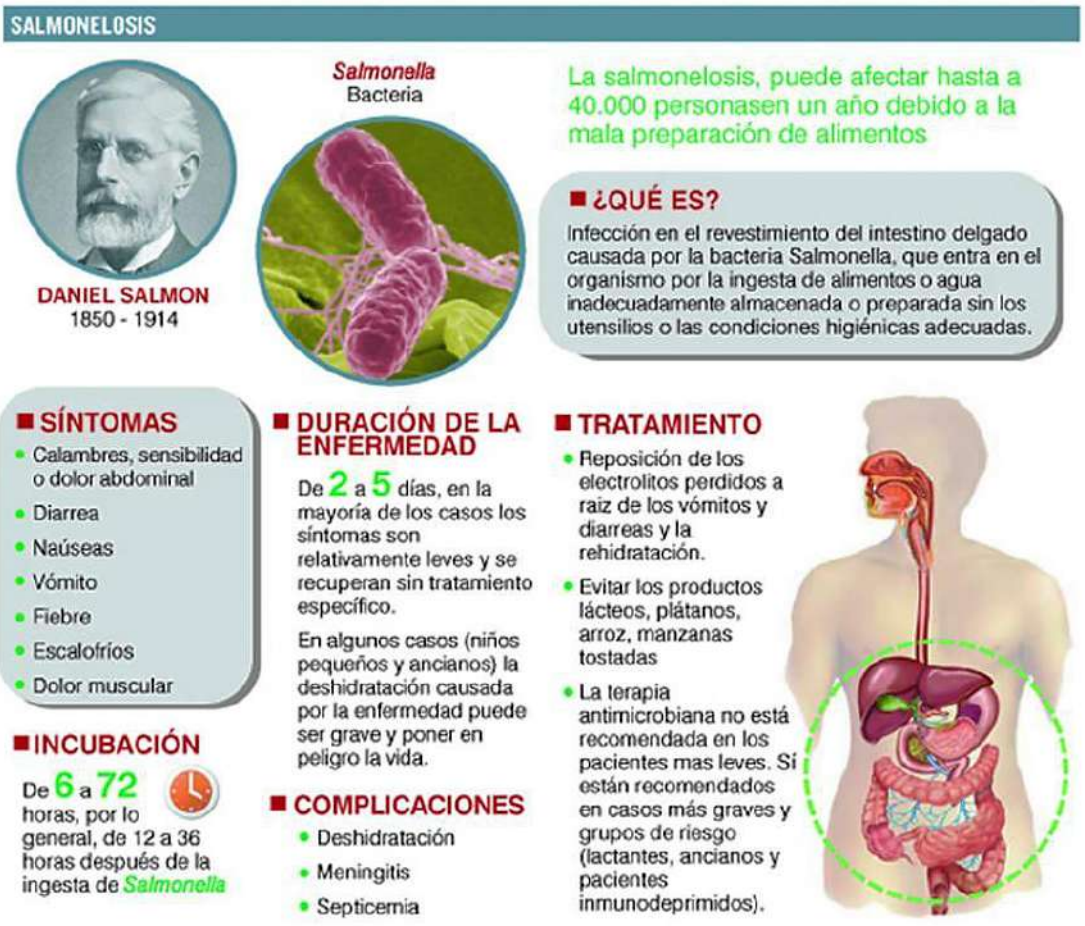


ódigo	Producto	Presentación
8311006	RAPID ONE PANEL PACK OF 20	20 galerías
8325106	RAPID INOC FLUID (2ML) PACK OF 20 TUBES	20 tubos
8309002	RAPID SPOT INDOLE RGT 15ML	15 mL
B0266A	MICROBACT OXIDASE STRIPS	50 tiras

Código	Producto	Presentación
R30858501	Salmonella H Polyvalent Phases 1 & 2	2 ml
R30858201	Salmonella O Polyvalent (Group A - S)	2 ml
R30957401	Salmonella O/Vi	2 ml

Para su aislamiento se hace un preenriquecimiento en medio líquido, un enriquecimiento en medio líquido, una diferenciación selectiva en placa, un aislamiento, una caracterización bioquímica y finalmente, una confirmación serológica de la bacteria aislada. El preenriquecimiento de la muestra alimenticia se realiza en un caldo de cultivo no selectivo para facilitar la recuperación de los daños o estrés que haya sufrido la bacteria que se encuentra en los alimentos crudos y procesados. El enriquecimiento selectivo directo (sin preenriquecimiento) y el posterior recuento directo de la bacteria se puede realizar en aquellas muestras de alimentos que sabemos que son sospechosos o que conozcamos el contenido de microorganismos, para esta fase se utilizan los caldos de lactosa o aguas de peptonas.

Se encuentra distribuida por todo el mundo y es universalmente reconocida como un agente zoonótico. Se han identificado numerosos reservorios animales, y muchos alimentos particularmente los de origen animal, han sido identificados como vehículos transmisores de este patógeno a los humanos y de la extensión a todos los procesos y manipulaciones que se realizan en las plantas industriales y en los hogares. La distribución ubicua en el medio ambiente, su prevalencia en la cadena alimentaria global, su adaptabilidad fisiológica para cambiar según el ambiente, su resistencia a las condiciones adversas, su virulencia, la impredecible patogenicidad de sus cepas invasivas, la prevalencia de los biotipos resistentes a antibióticos, el continuo incremento global de los casos de salmonelosis humana y su impacto económico en la industria alimentaria, hacen necesaria la continuidad de la vigilancia y el control estricto, a todos los niveles, de la producción de alimentos.



El importante crecimiento del comercio internacional de alimentos entre países que tienen diferentes niveles de higiene en su industria agroalimentaria y en sus procesos agrícolas produce un problema de salud pública de elevada complejidad. La ubicuidad de esta bacteria asegura la preeminencia de este patógeno en la cadena alimentaria global y su importancia como agente causante de toxiinfecciones alimentarias.

La bacteria vive en el tracto intestinal de los animales infectados incluido el hombre y se excreta a través de las heces, pudiendo permanecer viable en el material fecal durante años fuera del huésped y transmitirse a los humanos a través del contacto de las manos con los animales o con todo aquello que haya sido contaminado por las heces, ya sea la paja de los lechos de los animales, la comida, las patas, el suelo e incluso su piel.

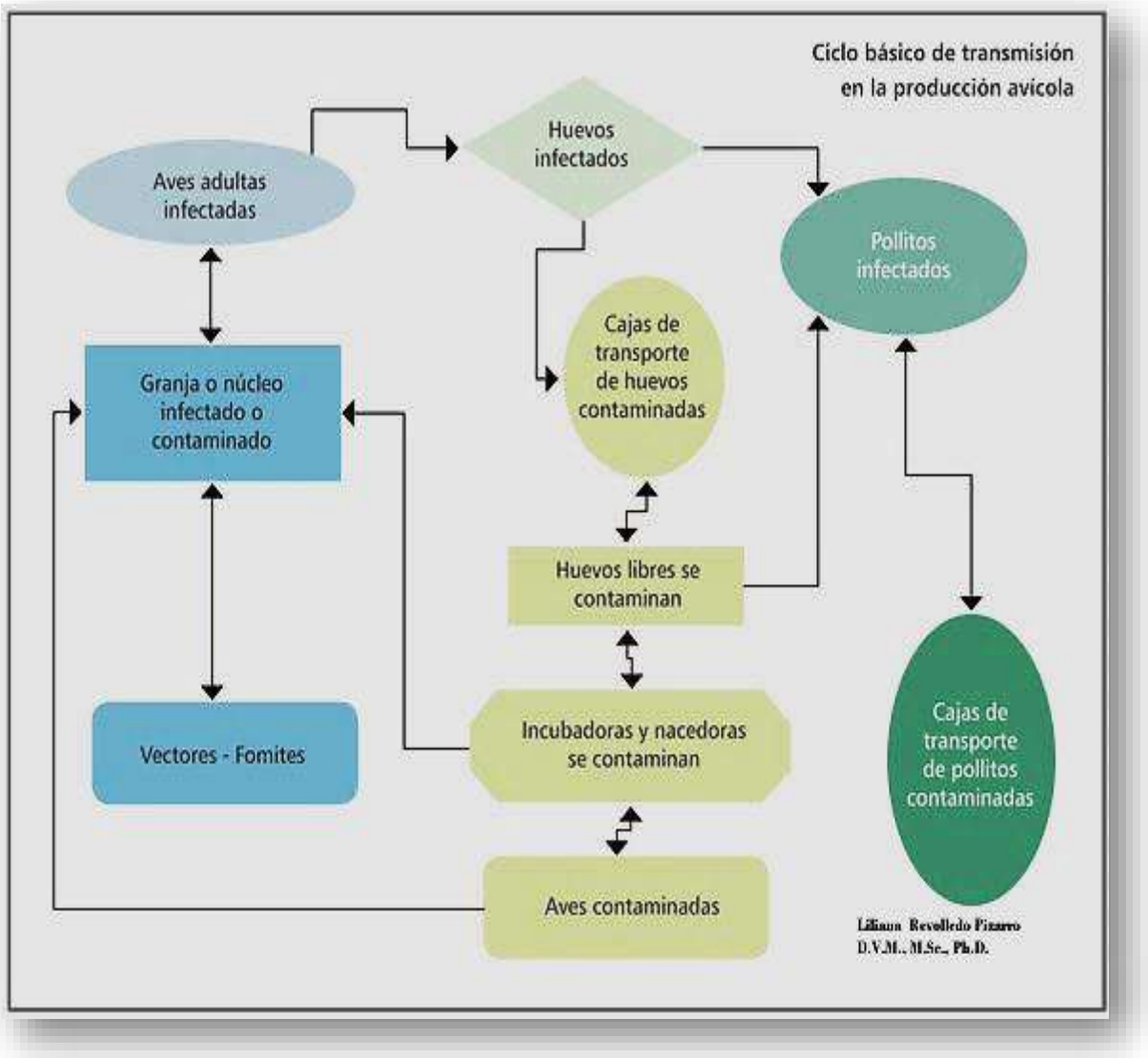
La comida, los piensos y el agua son los vehículos primarios. La contaminación puede extenderse a todo un rebaño de animales durante el transporte al matadero, o bien en las cuadras del mismo durante el período de descanso de los animales antes del sacrificio. La carne, la carne de ave de corral, los productos lácteos, el contagio persona-persona y el contagio animal doméstico-persona son algunas de las principales causas de los brotes epidémicos producidos. Los alimentos de origen animal se contaminan a través de los equipos sucios con material fecal y por ambientes contaminados de los mataderos. La contaminación cruzada se produce por el contacto de los alimentos crudos durante todo su proceso de elaboración con alimentos o utensilios contaminados, pudiendo ésta permanecer y multiplicarse en los equipos y en el ambiente de cualquier proceso de manipulación y/o procesado de alimentos.

Los cambios en los hábitos alimenticios, los catering a gran escala, y el incremento del comercio mundial de alimentos y de ingredientes de alimentos han contribuido en gran manera a que se observe un incremento significativo de los brotes epidémicos, siendo la salmonelosis la enfermedad líder en brotes de toxiinfecciones alimentarias en Europa y en E.E.U.U. Durante las últimas décadas, ciertos fagotipos de *S. enteritidis* han provocado graves problemas en la cría de pollos, en la cría de polluelos y en la producción de huevos, debido a una transmisión ovárica. Las infecciones humanas debidas a estos fagotipos se han incrementado en muchos países en los últimos años. Así, los pollos, los pavos, las ocas y los patos son el reservorio animal más importante, mientras que las canales de pavo y de pollos están frecuentemente contaminadas por *Salmonella* que llega a la canal del animal a través del contenido del tracto intestinal o del material fecal retenido en las patas o en las plumas.

Un 30% del material fecal del interior del animal, un 60% de las canales de pollo refrigeradas, y un 80% de los hígados refrigerados están contaminados por algún tipo de bacteria patógena de esta familia. Las contaminaciones cruzadas son un gran problema debido a las características del sacrificio de estos animales, siendo críticos los siguientes pasos: el desplumado, la evisceración y el enfriamiento. La contaminación cruzada provocada por las manos de los manipuladores, por el equipo y por los utensilios utilizados durante el sacrificio pueden extender la bacteria hasta las canales o los trozos de canales sin infectar.

Los huevos pueden infectarse de dos formas distintas: bien por la vía transovárica a partir de gallinas infectadas (también sucede en patos y en pavos), o bien por la penetración de la bacteria a través de la cáscara y de las membranas del huevo. La superficie de la cáscara puede contaminarse en la cloaca del animal o por exposición del huevo en ambientes contaminados con materiales fecales. Los productos del huevo deshidratados y congelados que no hayan sido pasteurizados son un importante vehículo.

Los huevos que se utilizan como ingredientes en industrias de pastelería o del helado o en los hogares son uno de los vehículos de transmisión más importantes. Las infecciones por *Salmonella* pueden cursar con tres cuadros clínicos: una gastroenteritis, una fiebre entérica, o una bacteriemia o septicemia (ICMSF, 1996). El primer cuadro clínico es la gastroenteritis, la cual tiene un período de incubación que puede variar desde las 5 horas a los 5 días. Normalmente la sintomatología aparece a las 12-36 horas posteriores a la ingestión de los alimentos contaminados. Los principales síntomas incluyen diarrea, náuseas, dolor abdominal, fiebres leves y escalofríos.



La diarrea puede ser copiosa y se acompaña de una deshidratación severa. También puede cursar, en algunas ocasiones, con vómitos, postración, anorexia, dolor de cabeza, y malestar general. Generalmente la sintomatología desaparece en 2-5 días. El segundo cuadro clínico es la fiebre entérica, la cual tiene un periodo de incubación que puede variar desde 7 hasta 28 días, dependiendo de la dosis inicial de bacteria ingerida. Como media generalmente es de 14 días. Cursa con malestar general, dolor de cabeza, fiebre alta persistente, dolor abdominal, dolor general del cuerpo y debilidad con constipación. También puede cursar con náuseas, vómitos, tos persistente, escalofríos y anorexia. También se han observado bradicardias, distensión abdominal y esplenomegalia.

La capacidad de crecimiento de *Salmonella* se reduce sustancialmente si la temperatura es inferior a los 15ºC, mientras que el crecimiento de la mayoría de las salmonelas se evita si la temperatura es inferior a los 7ºC. Así, el almacenamiento de los alimentos perecederos debe mantenerse por debajo de la temperatura mínima de crecimiento del microorganismo. Aunque la congelación puede afectar muy seriamente a la supervivencia de *Salmonella*, no garantiza su destrucción total en los alimentos. Así, durante este proceso, quedará muy dañada y, por este motivo, en el momento de analizar los alimentos almacenados en congelación se recomienda realizar un proceso de preenriquecimiento.

La muerte de la bacteria se producirá si se excede la temperatura máxima de crecimiento, 49,5ºC. Valores situados por encima de ésta serán adecuados para almacenar los alimentos en condiciones de temperaturas elevadas, evitándose el crecimiento y el desarrollo. El pH mínimo de crecimiento es 3,8 y el máximo 9,5. El tipo de ácido presente es muy importante. Los ácidos inorgánicos como el ClH y el ácido cítrico, permiten el crecimiento de *Salmonella* hasta valores a 4, mientras que el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico, tienen un mayor poder bacteriostático impidiendo el crecimiento a pH inferiores a 5.

Los ácidos orgánicos han sido investigados por su actividad bactericida y porque todos ellos son generalmente reconocidos como seguros; por ello, pueden ser utilizados como conservantes en muchos alimentos. El ácido acético y el propiónico se han encontrado como los que tienen mayor efecto inhibidor. El ácido málico y el ácido láctico han presentado una actividad intermedia, y el ácido tartárico y el cítrico tienen una menor actividad inhibidora. La actividad de agua es uno de los factores que más afecta al crecimiento de *Salmonella*. El límite inferior se sitúa en valores de 0,945, pero puede sobrevivir durante un año o más en alimentos que tengan actividades de agua inferiores, tales como el chocolate, la pimienta negra, las gelatinas o la manteca de cacahuete. Las sales presentes en los alimentos o añadidas para conservarlos tienen un efecto bacteriostático, ya que las sales captan el agua presente en el alimento haciendo disminuir la actividad de agua e impidiendo el crecimiento de la bacteria.

Presiones con valores de 500-700 Mpa matan rápidamente las células vegetativas de bacterias, levaduras y hongos, aunque las esporas bacterianas son mucho más resistentes. Ciertas enzimas son inactivadas y algunas proteínas solubles son desnaturalizadas, pero los compuestos responsables del sabor no se ven afectados. Los tratamientos a altas presiones pueden inactivar los microorganismos a temperatura ambiente sin la utilización de conservantes, permitiendo que se mantengan las características organolépticas.

Los principales factores que contribuyen a las toxiinfecciones alimentarias provocadas por *Salmonella* a través de los alimentos derivados de las aves de corral, son:

- Refrigeración incorrecta de los alimentos.
- Preparación anticipada de los alimentos.
- Elaboración inadecuada o el proceso térmico inadecuado.
- Contaminación de los alimentos por un manipulador enfermo.
- Recalentamiento inadecuado de los alimentos cocinados.
- Almacenamiento en caliente de los alimentos.
- Contaminaciones cruzadas entre alimentos crudos y cocidos.
- Limpieza inadecuada de los utensilios que están en contacto con los alimentos.
- Ingestión de alimentos crudos.

Los pollos son uno de los vehículos más comunes para que, con una contaminación inicial, con un inapropiado cocinado, con una contaminación cruzada y con un enfriamiento inadecuado, se pueda producir una toxiinfección. Los mecanismos de contaminación en las canales de aves de corral se inician con la retención de la bacteria en la película líquida que hay en la superficie de la piel, desde la cual la bacteria migra hacia la piel y queda atrapada en sus arrugas y grietas. El proceso de retención comienza en los animales vivos y aumenta durante el escaldado en el proceso de carnización. El escaldado abre los folículos de las plumas, hecho facilitado por el proceso de desplumado, lo que mantendrá abiertos los folículos durante todo el proceso hasta el oreo, momento en el que se cerrarán y mantendrán atrapado al microorganismo en su interior. Más tarde, y debido al agua durante el proceso de inmersión, los microorganismos se adherirán alrededor de los polisacáridos y de las fibras de colágeno. Esta adherencia es rápida, con tan sólo 15 segundos de exposición es suficiente.

Durante el proceso de evisceración hay una transferencia continua de microorganismos desde las canales a las manos de los trabajadores, a los utensilios y a las superficies de los equipos y, también, hay una transferencia de microorganismos entre las canales. Cuando se corta el tracto intestinal y se elimina de forma manual o bien mecánicamente es fácil que haya una contaminación fecal de las canales. Por lo tanto, el proceso de evisceración es uno de los puntos de contaminación cruzada más importantes en todo el proceso de carnización de las aves de corral. Durante el lavado por aspersión de las canales, después del eviscerado e inspección, se elimina la mayoría de la materia orgánica y, con ello, algunos de los patógenos, quedando sustituido por una superficie fluida de agua limpia. Los fabricantes se esfuerzan por mantenerse al día en el control de patógenos diariamente, incluso cada hora. En la actualidad las plantas de producción emplean muchos programas como BPM y APPCC. Estos programas ayudan al procesador a rastrear e inspeccionar el producto para asegurarse que llega al consumidor de forma segura. Las prácticas de control de patógenos diferirán de una planta a otra, así como de una industria a otra. A continuación, se exponen algunas reglas simples a tener en cuenta para la prevención de la contaminación por patógenos:

Materias primas: Ya se trate de aditivos, especias o leche cruda, las empresas buscan trabajar con proveedores que proporcionen un COA (Certificado de Análisis) u otros resultados de pruebas que indiquen que el producto cumple con la calidad microbiológica requerida.

Una vez recibidas, las materias primas se deberían almacenar a la temperatura indicada, en áreas separadas o restringidas de los productos acabados. La rotación de materias primas debería ser en base a FIFO (Primero en entrar, Primero en salir). Si no se utiliza la totalidad del ingrediente, el recipiente debe volver a cerrarse y almacenarse apropiadamente.

Procesado: Se debe asegurar que el producto se somete a un tratamiento térmico adecuado. Los fabricantes con un paso de cocción o pasteurización deben verificar el proceso. Si no se alcanzan las temperaturas indicadas es muy probable que las bacterias patógenas puedan sobrevivir en el producto. Si es necesario, tras este paso proceda al enfriamiento rápido para asegurar la calidad del producto. Los alimentos refrigerados deben almacenarse a temperaturas apropiadas inmediatamente después del tratamiento. Evite dejar los alimentos refrigerados a temperatura ambiente durante períodos prolongados, favorecerá el crecimiento microbiano.

Planta de producción: En un mundo ideal, todas las plantas deberían mantener separadas las áreas crudas y las de cocción; sin embargo, este generalmente no es el caso. En una planta donde no sea posible, los empleados deben mover las materias primas y los productos acabados a través de la planta lo más rápidamente posible. Las áreas que se superponen deben ser consideradas zonas de alto riesgo y tratadas en consecuencia. También se debe controlar el flujo del personal entre productos/áreas crudos y acabados. El tráfico de vehículos y peatones también debe ser limitado. Los empleados deben permanecer dentro de su área de trabajo designada. También es beneficioso tener carros, carretillas elevadoras y otros equipos dedicados exclusivamente a un área.

Empleados: Los empleados que trabajan en contacto directo con los alimentos, con superficies de contacto con alimentos y materiales de envasado de alimentos pueden ser responsables de la transmisión de patógenos. Es imprescindible que los empleados se adhieran a GMP y tengan una buena higiene personal.

Limpieza: Una instalación limpia se traduce en productos seguros. La monitorización de las dos áreas de productos crudos y acabados, el mantenimiento de un entorno limpio y evitar que los productos transformados se recontaminen son sólo el principio de un control de patógenos. Todas las funciones de limpieza y desinfección deben ser estrechamente monitorizadas a través de la inspección antes de la producción y tests ambientales. Si la producción se inicia con un equipo limpiado y desinfectado de forma inadecuada, todas las demás medidas utilizadas para el control de patógenos serán ineficaces.

Educación del consumidor: El transporte de productos a los consumidores ofrece muchas oportunidades para la alteración de temperatura a lo largo de la cadena de distribución. Niveles mínimos de patógenos en productos acabados pueden multiplicarse rápidamente si la temperatura adecuada no se mantiene a lo largo de la cadena de distribución. Los manipuladores de alimentos, incluidos los consumidores, deben ser formados sobre los peligros potenciales de enfermedades transmitidas por los alimentos si los productos no se manejan adecuadamente. En general, es imprescindible determinar las áreas de una planta que pueden causar contaminación o estar en riesgo de contaminación por patógenos.

Se deben realizar análisis de peligros y evaluaciones de riesgo con regularidad. Una instalación bien gestionada identifica todos los peligros y riesgos para proporcionar un control eficaz. Una vez identificadas estas áreas, procesos y prácticas, se deben incorporar a un programa de prevención adecuado. Garantizar la seguridad alimentaria a través del control de patógenos, es un esfuerzo de cooperación que involucra a todos los empleados.

El novedoso concepto de **defensa alimentaria** se refiere principalmente a la contaminación intencional del suministro de alimentos, amenazando de esta manera la seguridad de la cadena agroalimentaria lo que puede significar grandes riesgos e inmensurables impactos. La prevención de la contaminación de los alimentos y la reducción de la probabilidad de la contaminación deliberada y el conocimiento de los peligros son los primeros pasos para construir unas estrategias efectivas de Food defense y requieren un esfuerzo recurrente en toda la cadena de suministro de alimentos.

La naturaleza intencional de estos riesgos ofensivos que se pueden originar en el entorno interno o externo de la industria alimentaria, significa que se deben considerar diferentes factores y se requieren diferentes tácticas para avanzar más allá de los enfoques de seguridad alimentaria comunes. Sin embargo, el conocimiento sobre técnicas básicas de defensa alimentaria sigue siendo limitado. Cada vez se hace más importante en la industria alimentaria lograr eliminar o eventualmente minimizar los riesgos de contaminación y la presencia de agentes biológicos, químicos y físicos para, de esta manera, asegurar que la elaboración y el consumo de los alimentos no pongan en riesgo a los consumidores.

La introducción e implementación de tecnologías que fundamenten los planes de aseguramiento de la inocuidad y de la calidad es uno de los puntos claves en las empresas alimentarias tanto para la permanencia, como el ingreso a nuevos mercados internacionales. Varios abordajes tecnológicos se han implementado en las plantas procesadoras de alimentos para contribuir a tener un mejor manejo y mayor control sobre los posibles riesgos asociados a los productos que elaboran. Dentro de los manuales de aseguramiento de la inocuidad se han incorporado en los últimos años, en especial las empresas de mercado internacional, el Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, HACCP – en sus siglas en inglés tal cual es muy utilizado en la producción e industria - que tiene como finalidad un análisis de los peligros en cada planta o proceso en particular según el producto que elabore, con el fin de tener un mayor control de los riesgos asociados con el alimento y determinar que método de control es el más conveniente y de qué manera poder realizarlo.

En este contexto diversos métodos y procedimientos de intervención, bajo el paraguas del Sistema HACCP están siendo utilizados en la industria frigorífica de carnes. Algunos ejemplos de estos métodos de intervención lo constituyen, la aplicación de vapor, agua caliente, diversos agentes sanitizantes y el empleo de ácidos orgánicos de cadena corta. La mayor parte de estas estrategias de intervención se llevan adelante en las etapas iniciales del procesamiento – primeras transformaciones, en la industria y en general conllevan la utilización combinada de más de una de estas herramientas.

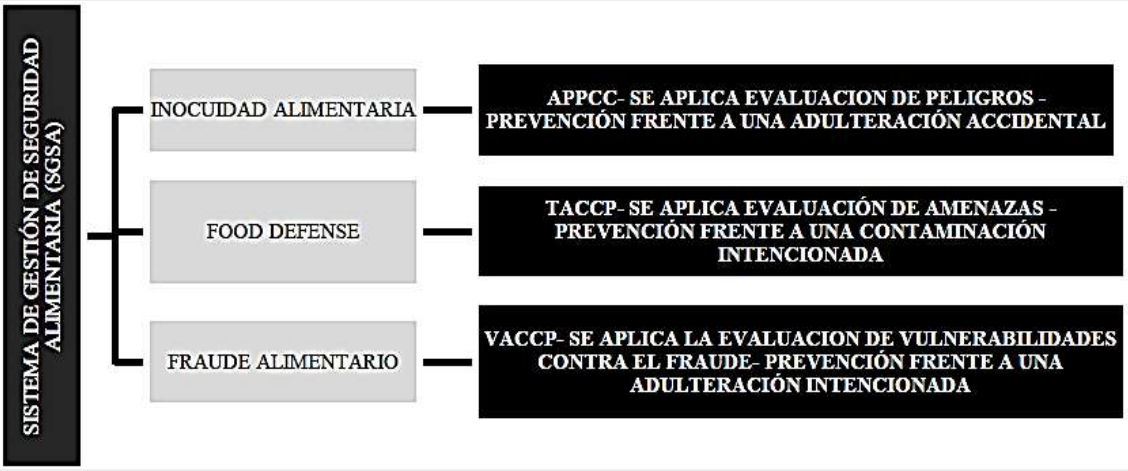
La aplicación y el empleo de ácidos orgánicos viene ganando adeptos en su aplicación comercial, en especial por cuestiones vinculadas a mejoras y resguardo en la salud pública y a aperturas reglamentarias y normativas (EFSA, 2018).

BACTERIA	FACTORES	Mínimo	Óptimo	Máximo
L. monocytogenes	Temperatura (ºC)	-1,5	30-37	45
	pH	4	6,0-8,0	9,6
	Actividad del agua	0,9	<0,97	–
	NaCl	<0,5%	–	20%
Salmonella spp	Temperatura (ºC)	5,2	35-43	46,2
	pH	3,8	7-7,5	9,5
	Actividad del agua	0,93	0,99	>0,99

Categoría de alimentos	Límites	Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
1.1.Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos	Ausencia en 25 g	ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
1.2.Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de L. monocytogenes, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	Hasta 100 ufc/g	ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
1.2.Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de L. monocytogenes, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	Ausencia en 25g	ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido
1.3.Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de L. monocytogenes, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	Hasta 100 ufc/g	ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil

La Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó en 2007, la contaminación intencional de alimentos como una de las principales amenazas a la salud pública del siglo XXI, por tanto, las administraciones y los productores de alimentos deben asumir la responsabilidad de proteger la cadena agroalimentaria contra actos de manipulación intencionada, lo que va a requerir la implementación de estrategias de defensa alimentaria. Food defense o defensa alimentaria abarca un conjunto de herramientas y protocolos que se aplican en la industria, para tratar de garantizar la seguridad en el suministro de alimentos frente a ataques deliberados cuya finalidad sea la de causar daños a los consumidores. Los planes de defensa alimentaria están basados en la adopción de medidas activas, para prevenir la contaminación intencionada y evitar los incidentes que pueden resultar de dicha acción. La diferencia básica entre la defensa de los alimentos y la seguridad alimentaria es que la primera se ocupa de la protección frente a la contaminación o adulteración intencional de los productos alimenticios y la segunda se centra en la contaminación no intencionada.

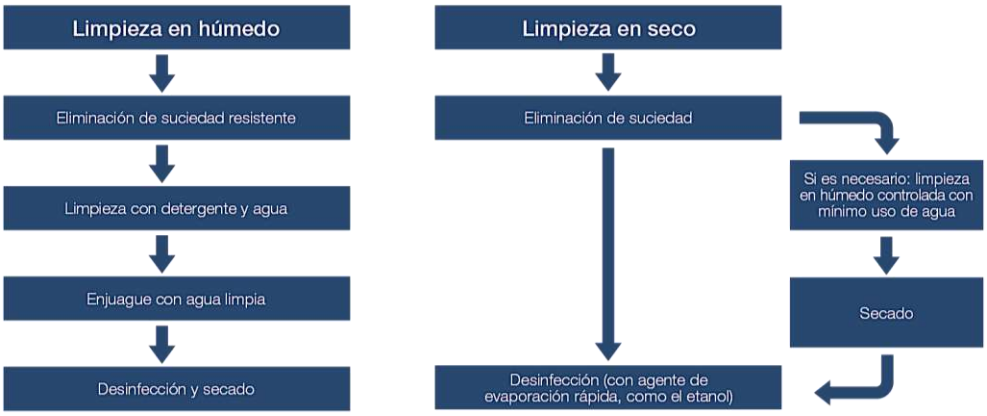
En Europa, el término **Food Defense** es un concepto de introducción reciente mientras que en Estados Unidos (EEUU) se empezó a usar en el año 2002. Un programa con puntos de vigilancia para detectar la contaminación de los alimentos, sea o no intencional, representa el punto de partida en cualquier programa básico de defensa alimentaria. La contaminación de los alimentos en la cadena de suministro ocurre, y puede producirse de manera natural, accidental y deliberada. El suministro de agua y alimentos inocuos para la salud del consumidor es un punto crítico en la sociedad actual y requiere de una protección específica. La Iniciativa Mundial de Seguridad Alimentaria (GFSI por sus siglas en inglés) es una organización que reúne a los principales profesionales implicados de la industria alimentaria para impulsar la mejora continua en los sistemas de gestión de las empresas integrantes del sector a nivel mundial. El GFSI ha definido que los sistemas de gestión de la seguridad alimentaria funcionan como un paraguas que engloba, por un lado, el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), por otro, un Análisis de Amenazas y Puntos de Control Crítico (TACCP) para identificar las amenazas, y, finalmente, un Análisis de la Vulnerabilidad al Fraude (VACCP), para evaluar y controlar las alteraciones premeditadas de los alimentos con fines económicos.



Sistema de Gestión de la Seguridad Alimentaria, según GFSI Tipos de manipulación intencionada de los alimentos

Hay 5 pasos para controlar a *Salmonella* en el sector alimentario

a. **Evitar su penetración en las instalaciones de procesamiento:** Asegúrese de que solo entren equipos, herramientas y utensilios limpios y desinfectados en el área de procesamiento. Lleve a cabo pruebas sobre los ingredientes crudos recibidos y segregue aquellos que supongan un riesgo para la contaminación. Implante medidas adecuadas de control de plagas. Los empleados deben mantenerse libres de infecciones por salmonela, recibir la debida formación para comprender las posibles fuentes de contaminación y aplicar las prácticas y procedimientos higiénicos necesarios para impedir la propagación de *Salmonella* en las instalaciones.
b. **Poner en práctica procedimientos adecuados de limpieza y desinfección:** La limpieza puede dividirse en dos categorías: limpieza en húmedo (para carne, verduras y productos lácteos) y limpieza en seco (para alimentos con bajo nivel de humedad).



Durante el procedimiento de limpieza en húmedo, pueden emplearse detergentes y desinfectantes. Al realizar la limpieza en seco, debe evitarse el uso de agua; los desinfectantes, además, deben ser de evaporación rápida. Si es necesario, puede llevarse a cabo una limpieza en húmedo controlada con mínimo uso de agua. Asegúrese de secar los equipos después de una limpieza en húmedo controlada, ya que cualquier resto de humedad podría incrementar el riesgo de desarrollo microbiano y contaminación cruzada. Todos los procedimientos de limpieza y desinfección deben ser validados para garantizar su eficacia incluso en los peores casos de suciedad. La eficacia de los procedimientos diarios de limpieza y desinfección validados debe ser monitoreada/verificada mediante inspección visual, ATP o hisopado microbiano, según corresponda. Todos los procedimientos de limpieza deben regirse por un programa de limpieza que detalle qué, dónde y cuándo limpiar, quién debe llevar a cabo la limpieza y de qué manera debe hacerlo.

c. **Implantar procedimientos de prevención de la contaminación por *Salmonella*:** Elija los métodos de limpieza correctos para evitar la propagación de la contaminación Evite el uso de mangueras de alta presión. Siempre que sea posible, limpie los equipos en áreas aisladas físicamente y reduzca al mínimo las operaciones de limpieza durante la producción de alimentos. La limpieza de suelos y otras superficies sucias debe realizarse evitando la contaminación por salpicadura y atomización de las superficies destinadas al contacto con los productos. Divida la producción en zonas para la manipulación de alimentos crudos y procesados

Aplique planes de codificación por color de zonas para clasificar las áreas según diferentes niveles de control de higiene (con zonas para alimentos crudos y procesados, por ejemplo). Use equipos de limpieza y utensilios de manipulación de alimentos específicos y codificados por color. Los equipos de limpieza y utensilios de manipulación de alimentos codificados por color permiten asegurar visualmente que solo se usen equipos con un determinado código de color en una zona concreta. De este modo, es más fácil evitar la contaminación cruzada por salmonela a través de equipos y utensilios trasladados entre, por ejemplo, las zonas de alimentos crudos y alimentos procesados. Si almacena sus utensilios de limpieza en portautensilios o tableros de sombras codificados por color, será más fácil garantizar que los utensilios permanezcan segregados por color mientras estén almacenados. El almacenamiento correcto favorecerá el secado rápido de los utensilios de limpieza y reducirá el riesgo de contaminación cruzada por salmonela entre ellos.

d. **Usar equipos con buen diseño higiénico:** Elija equipos y utensilios de limpieza con un diseño higiénico apropiado que facilite la limpieza e impida el desarrollo microbiano. Algunas de las características del diseño higiénico son las superficies lisas, la construcción monobloque, la facilidad de desarmado y la ausencia de hendiduras y revestimientos. Obtenga más información sobre el diseño higiénico de cepillos para el sector alimentario en este artículo técnico.
e. **Monitorear la presencia de *Salmonella* en el entorno:** Desarrolle un programa de toma rutinaria de muestras de salmonela para sus entornos de producción. Un programa de monitoreo ambiental (PMA) le ayudará a evaluar la eficacia de sus prácticas higiénicas en general, monitorear la presencia de patógenos transitorios en el ambiente y mitigar los posibles nichos de refugio y desarrollo. Asegúrese de incluir los equipos de limpieza en su programa de monitoreo ambiental.

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un creciente problema de salud pública, donde los agentes patógenos bacterianos juegan un rol trascendental. La industria alimentaria ha implementado diversas medidas de control para enfrentar esta situación, utilizando en la última década algunas herramientas biotecnológicas, como es la aplicación de **bacteriófagos** directamente en los alimentos. Sus propiedades exclusivamente bactericidas e inocuas para el hombre y los animales han sido descritas ampliamente en la literatura científica, existiendo a la fecha algunos productos comerciales disponibles en el mercado internacional.

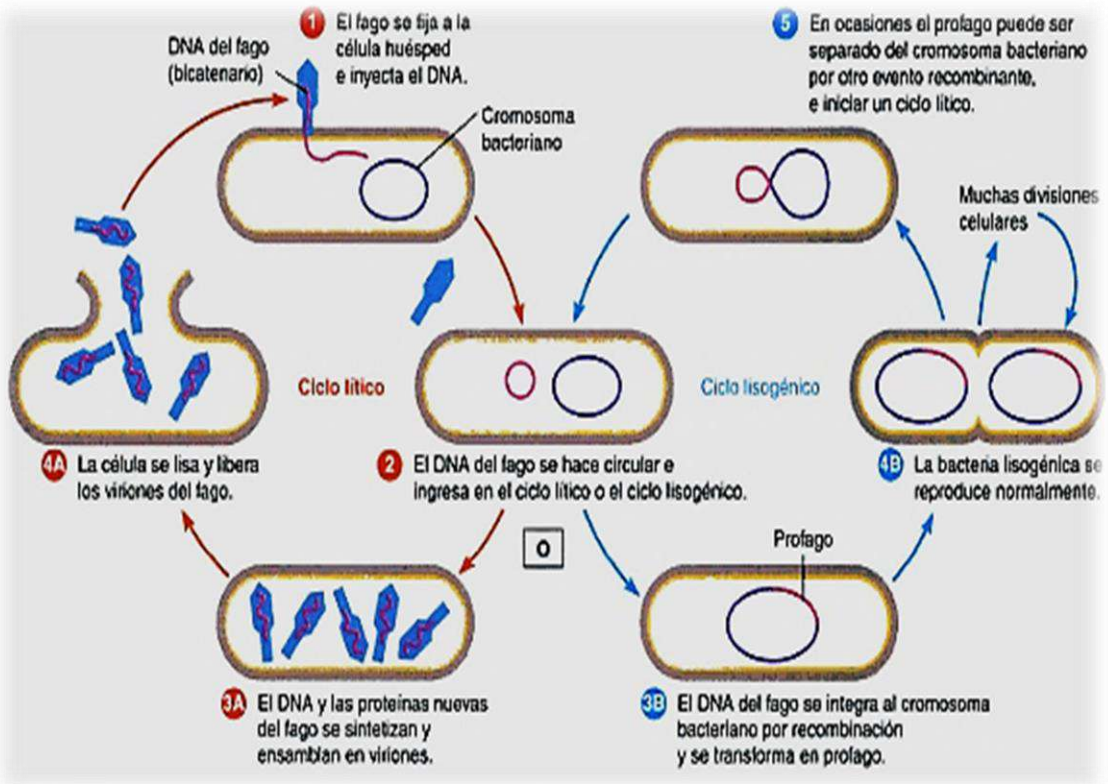
A pesar de esto, diversos son los factores que pueden influir en su efectividad bio-controladora en alimentos, por lo que conocer dichos factores resulta fundamental antes de considerar su aplicación. De esta manera, se logrará obtener la máxima actividad reductora de la carga bacteriana, generando así un alimento más seguro. Se encuentran en estudio el uso de bacteriófagos como agentes bio-controladores de patógenos alimentarios, incluyendo antecedentes históricos, taxonomía y descripción biológica de bacteriófagos, así como ventajas, desventajas y consideraciones de su aplicación en alimentos. La seguridad de los alimentos puestos en el mercado es una preocupación fundamental para la industria alimentaria. Este es especialmente el caso de los alimentos listos para el consumo, ya que no son sometidos a ningún tratamiento térmico que pueda destruir los microorganismos que hayan podido crecer durante el almacenamiento del alimento. Actualmente, existe una gran variedad de tratamientos físicos o químicos que se aplican a los alimentos para garantizar la ausencia de microorganismos patógenos o incrementar su vida útil.

La elección de dichos tratamientos está condicionada por factores como su coste, normativa aplicable o alteración de las propiedades organolépticas del alimento. Una de las nuevas tecnologías surgidas en los últimos años para el control de microorganismos indeseables es el uso de bacteriófagos o fagos, virus que infectan determinadas bacterias de forma específica, y que ya fueron descritos en el post Bacteriófagos: pequeños grandes aliados en la lucha contra los patógenos alimentarios. Aunque el uso de fagos en alimentos está aceptado en países como Estados Unidos o Australia, en Europa esta aplicación se encuentra aún en un limbo legal.

Por un lado, los fagos no están incluidos en la lista de aditivos alimentarios autorizados, aunque su aplicación encaja más con la definición de aditivo alimentario. Por otro lado, en algunos países como Holanda se han concedido autorizaciones temporales específicas para la aplicación de fagos en productos como la carne de pollo. Adicionalmente, los fagos se pueden aplicar a alimentos que vayan a ser exportados a países en los que su uso está autorizado y, por ejemplo, la FDA norteamericana valora positivamente este tratamiento en los alimentos exportados a EEUU.

Como paso previo a la autorización del uso de fagos como coadyuvantes tecnológicos para la descontaminación de alimentos, es necesario demostrar que este uso es seguro, en cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento (CE) Nº 178/2002, de 28 de enero de 2002, del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

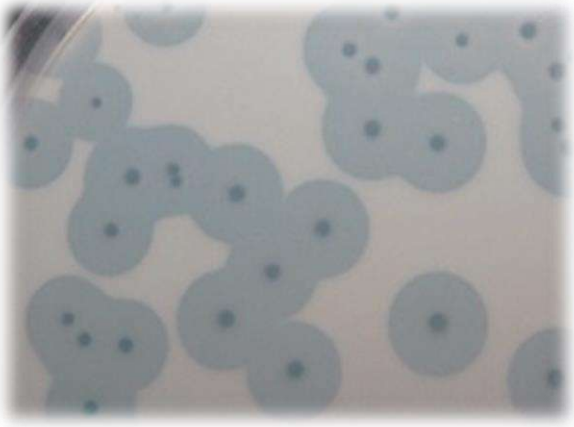
En este sentido, la EFSA emitió en 2018, una opinión favorable al uso del producto **Listex P100** para la reducción de niveles de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo en los sectores cárnico, avícola, pescados y mariscos y lácteos. Listex P100 es un producto desarrollado por Micreos FoodSafety y comercializado por Betelgeux. El producto contiene el fago P100 en una concentración de 2×1011 UFP (Unidades Formadoras de Placas) por mililitro. El fago P100 es específico de bacterias del género Listeria y se aplica diluido, con una dosis de uso recomendada de 1×109 UFP por 100 gramos de alimento.



El Panel de Peligros Biológicos (BIOHAZ) de la EFSA evaluó los siguientes aspectos relativos a la aplicación del fago P100 a los alimentos:

- La seguridad de la aplicación desde el punto de vista toxicológico
- La eficacia del tratamiento
- La aparición potencial de resistencias o susceptibilidad reducida a antimicrobianos
- Los riesgos medioambientales

Esta evaluación se basó tanto en la información suministrada por el fabricante del producto como en los datos disponibles en la literatura científica. El informe de la EFSA indica que no se considera que haya un riesgo para la salud humana derivado del uso del fago P100 en alimentos. Esto es debido a que este fago solamente produce lisis de bacterias del género Listeria y que no hay transducción del ADN bacteriano. Asimismo, el informe estima que no hay un riesgo medioambiental significativo, ya que la población de fagos decrece de forma natural en ausencia de bacterias huésped. En cuanto a la posible aparición de resistencias entre la población de Listeria o una reducción de la susceptibilidad a los antimicrobianos, existe un riesgo potencial, aunque bajo, que se minimiza si se toman las medidas de limpieza y desinfección adecuadas.



El informe de la mesa también avala la eficacia del uso de Listex P100 para la reducción de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo. Según los ensayos evaluados, una concentración de fagos de 109 UFP por cm^2 de alimento consigue reducciones logarítmicas de 2,52, 1,74 y 3,42 en los niveles de Listeria monocytogenes en pescado, carne y productos lácteos, respectivamente. De esta manera, el uso de fagos permite reducir de forma significativa los niveles de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo, pero no debe sustituir a las buenas prácticas de higiene y de producción, sino que es un complemento a las mismas.

El uso de fagos para el control de microorganismos indeseados en la industria alimentaria es una novedosa herramienta que aprovecha un mecanismo que ocurre en la Naturaleza desde hace millones de años. La elevada especificidad de la interacción entre el fago y la bacteria huésped hace que éste sea un tratamiento seguro y que no afecta a las propiedades organolépticas del alimento. Debido también a esta elevada especificidad, el uso de fagos no sustituye a los tratamientos de higiene y control microbiano convencionales, sino que debe considerarse un complemento para aumentar la seguridad de los alimentos producidos. El dictamen positivo de la EFSA sobre este tipo de aplicaciones abre la puerta a que el uso de fagos se convierta en una herramienta común en la industria alimentaria en el futuro próximo.

11. Control de patógenos y programas de muestreo (métodos y materiales utilizados)

Patógenos
***Salmonella* spp**
Listeria monocytogenes (Se encuentra comúnmente en ambientes húmedos o fríos / fríos y en desagües)
Staphylococcus aureus (Comúnmente vinculado a manipuladores de alimentos, por ejemplo, manos del personal)
Bacillus cereus (Entornos de producción de alimentos secos)
Campylobacter jejuni (Se encuentra en entornos de procesamiento de carne y aves de corral)
Organismos de deterioro
Levaduras y mohos (Las pruebas de aire y superficie son importantes para identificar su presencia)
Organismos indicadores
Coliformes
Escherichia coli (Asociado con agua contaminada y áreas donde puede ocurrir contaminación fecal, como manos del personal)
Enterobacteriaceae
Recuento de placas aeróbicas
Bacterias del ácido láctico (LAB)
***Listeria* spp.**
***Pseudomonas* spp.**

Como hemos visto hasta ahora, los patógenos más importantes y difíciles de erradicar en una industria de alimentos (una vez que aparecen) son: *Listeria; Salmonella; y Enterobacterias* (también son indicadores). Asimismo, veremos más adelante los indicadores y deteriorantes como aerobios mesófilos totales y flora micótica total. Para ejemplificar tomaremos como base a Listeria monocytogenes.

La listeriosis se asocia en gran medida con los **alimentos RTE o LPC (ready to eat o listos para consumo)**. Está bien establecido que los alimentos que representan el mayor riesgo de listeriosis transmitida por los alimentos son aquellos alimentos RTE que tienen características intrínsecas (como el pH y la actividad del agua) que apoyan el crecimiento de L. monocytogenes, mientras que los alimentos RTE que representan el menor riesgo de listeriosis transmitida por los alimentos son alimentos que tienen características intrínsecas que impiden el crecimiento de L. monocytogenes. Por lo tanto, en la formulación de alimentos RTE y para que tengan características intrínsecas que no apoyen el crecimiento de L. monocytogenes, debemos observar:

- **El pH del alimento es menor o igual a 4.4;**
- **La actividad hídrica de los alimentos es menor o igual a 0,92; y**
- **El alimento está formulado para contener una combinación de factores científicamente demostrados para prevenir el crecimiento (el concepto de "obstáculos").**

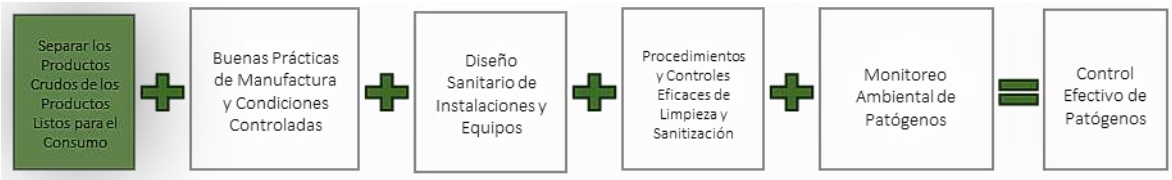
Los alimentos pueden tener naturalmente características que impiden el crecimiento de L. monocytogenes, o pueden procesarse deliberadamente para lograr o alcanzar tales características. Por ejemplo, las ensaladas de tipo delicatessen (como la ensalada de papas) se pueden procesar para lograr un pH que sea menor o igual a 4.4 con la adición de una sustancia ácida (como el vinagre). Algunas sustancias antimicrobianas se agregan a los alimentos durante la producción. Por ejemplo, a veces se agrega ácido sórbico para prevenir el crecimiento de L. monocytogenes en alimentos como los quesos, y comúnmente se agrega una combinación de ácido sórbico y ácido benzoico para prevenir el crecimiento de L. monocytogenes en alimentos como ensaladas tipo delicatessen Otras substancias antimicrobianas pueden producirse de forma natural en un alimento o producirse en un alimento fermentado por la fermentación microbiana.

Ejemplos de alimentos RTE que apoyan el crecimiento de L. monocytogenes y que se ha encontrado que están contaminados: Leche no pasteurizada y pasteurizada, productos lácteos altos en grasa, queso blando sin madurar (requesón, queso crema, ricota), crustáceos listos para comer cocidos (cangrejo), mariscos ahumados, queso blando fresco (Queso Fresco), queso semiblando (Azul, Brick), queso de maduración suave (Brie, Camembert), ensaladas tipo delicatessen, sándwiches, frutas y verduras recién cortadas y mariscos de moluscos crudos y un ejemplo de un alimento RTE que no apoya el crecimiento de L. monocytogenes, pero que ha encontrado que está contaminado con L. monocytogenes, es el helado.

L. monocytogenes puede sobrevivir más tiempo en condiciones ambientales adversas que muchas otras bacterias vegetativas que presentan un problema de seguridad alimentaria. Además de poder sobrevivir y crecer a temperaturas de refrigeración, L. monocytogenes tolera altas concentraciones de sal (como en soluciones enfriadoras de salmuera no cloradas) y sobrevive al almacenamiento congelado durante períodos prolongados. Sobrevive a las condiciones ácidas y es más resistente al calor que muchos otros patógenos transmitidos por los alimentos que no forman esporas, aunque puede ser eliminado por procedimientos de calentamiento como los utilizados para pasteurizar la leche.

La aplicación de los requisitos de BPM y HACCP a la producción de alimentos RTE puede minimizar o prevenir significativamente la contaminación con L. monocytogenes (por ejemplo, a través de controles sobre materias primas u otros ingredientes, medidas de control listericidas para destruir consistentemente las células viables de L. monocytogenes, formulaciones listeristáticas para prevenir células viables de L. monocytogenes desde el cultivo, la segregación de los alimentos que se han cocinado de los que no, los controles de saneamiento, el diseño de equipos sanitarios y las barreras físicas (separación) para evitar la contaminación cruzada).

La FDA, recomienda que los procedimientos de monitoreo ambiental utilicen un enfoque basado en el riesgo, en el que establezcan estrategias para el monitoreo ambiental (por ejemplo, muestreo ambiental, sitios de muestreo y frecuencia, procedimientos de prueba y acciones correctivas) basadas tanto en las características de sus productos alimenticios RTE como en los métodos de procesamiento utilizados para producir esos productos. En general, cuanto mayor sea el riesgo de que un alimento RTE pueda contaminarse con L. monocytogenes y apoyar el crecimiento de la organización, mayor será la frecuencia de muestreo y pruebas ambientales, y más estrictas serán las acciones correctivas si detecta Listeria spp.



Vamos a proceder a ejemplificar el tema sobre una planta de lácteos: Con el fin de identificar áreas de vulnerabilidad, cada instalación debe recopilar información de antecedentes pertinentes y realizar una evaluación. Esto ayudará a determinar la cantidad, ubicación y frecuencia de los muestreos, y brindará una base sólida para el programa, en función del riesgo de la instalación. Al elaborar o actualizar un programa, es ideal revisa los antecedentes de los últimos 24 meses porque esto contendrá los cambios ambientales debidos a las estaciones del año, modificaciones en el volumen/combinación de la producción, vacaciones del personal, días festivos y demás factores cíclicos que afectan el ambiente de la planta.

Entre las consideraciones para la evaluación de la instalación se encuentran:

- Exposición del producto al ambiente de procesamiento después de la pasteurización, pero antes del empaquetamiento.
- Manipulación del producto por el personal antes del empaquetamiento.
- Flujos de tránsito e interacciones del personal con los productos y equipos.
- Separación física de los productos crudos y RTE.
- Procesamiento prolongado y su repercusión.
- Dificultades del diseño de equipos e instalaciones.

Desarrollo de un plan de muestreo

¿Qué se debe analizar: *Listeria spp. o L. monocytogenes?*

Listeria spp. es un grupo indicador amplio que, cuando se detecta, indica que las condiciones también son propicias para el desarrollo o supervivencia de *Lm.* El objetivo del programa consiste en buscar, encontrar y eliminar enérgicamente *Listeria* spp. de los ambientes de procesamiento, garantizando así la ausencia de *Lm*. Un programa basado en la detección de *Listeria* spp. es más conservador que uno que monitorea *Lm* específicamente, pues *Listeria* spp se encontrará con mayor frecuencia en el ambiente. Otra ventaja del monitoreo de *Listeria* spp. es el tiempo para obtener resultados; es posible que los resultados de los análisis de muestras ambiental se obtengan en menos tiempo y entonces, resultados más rápidos generarán medidas de respuesta e intervención más rápidamente. El monitoreo para detectar la presencia de *Listeria* spp, por lo tanto, se considera una mejor práctica.

El objetivo de un buen programa de muestreo, consiste en buscar agresivamente y encontrar cualquier *Listeria* spp. presente en una instalación, para poder eliminarla. Las superficies de contacto con el producto, salas de procesamiento y áreas adyacentes a las áreas de procesamiento, se designan como ya lo vimos anteriormente, de acuerdo a una serie de anillos o zonas progresivamente más grandes, en los que la Zona 1 es una superficie de contacto con el producto y la Zona 4 pudiese ser el piso de un almacén. La designación de zonas tiene un objetivo doble: 1) desarrollar una actitud para tomar medidas que prevengan el desplazamiento de patógenos a través de zonas adyacentes hacia las superficies de contacto con producto, y 2) establecer un conjunto común de términos para facilitar la discusión entre los profesionales. Las zonas se definen en función de la cercanía al producto y el posible riesgo de contaminación. Usualmente, las designaciones por zona son fijas, pero pudiesen ser dinámicas dependiendo de la distribución de las instalaciones, la actividad del personal o las condiciones de los equipos.

Existe una diferencia importante entre **zonas** y **sitios o lugares de muestreo**. Los sitios del muestreo son la ubicación física específica de la muestra (eje del motor #43, pasamanos de la plataforma de la mezcladora, guía izquierda en la banda transportadora del producto), la cual debe registrarse con cada muestra. Asimismo, el plan de muestreo para el monitoreo de la Zona 2 en una línea específica de manufactura, contendrá una lista de todos los sitios específicos de muestreo que sean superficies sin contacto con alimentos, inmediatamente adyacentes a la Zona 1. La lista de la Zona 3 contendrá sitios de muestreo más alejados de la Zona 1 y adyacentes a la Zona 2, y así sucesivamente.

Se considera que ningún método de análisis microbiológico viable permite afirmar con total seguridad que el producto analizado presenta la calidad microbiológica deseada, pero si nos indica la probabilidad de que sea cierto, según conclusiones del ICMSF de 2006. En la gran mayoría de las industrias alimentarias, por razones materiales, prácticas y/o económicas, se realizan los análisis microbiológicos sobre unidades de muestra de las cuales deben extraerse los microorganismos para ser cuantificados, aislados e identificados si la situación lo requiere. Un factor fundamental para realizar correctamente dichos controles es el método de muestreo, el cual debe ser simple, rápido, económico, sensible y no presentar riesgo para el operador o el alimento. **Tradicionalmente los métodos de control de superficies se agruparon según el método de muestreo en cuatro categorías (ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods):**

- ✓ **Hisopados:** consisten en la frotación de área limitada con un hisopo o una esponja. Tras el hisopado se introducen en un tubo con diluyente a partir del cual se realizará el estudio microbiológico, dando lo resultados en unidades formadoras de colonias (ufc) por cm2.

- ✓ **Enjuagues:** se agrega un volumen determinado de solución estéril de dilución sobre la superficie a hacer un muestreo, se lava y se recupera el líquido para efectuar los estudios microbiológicos.
- ✓ **Métodos de impresión por contacto:** se hace contactar la superficie a estudiar de forma directa o indirecta con el medio de cultivo, el cual se incuba para efectuar los recuentos.

Las técnicas de análisis microbiológico más utilizadas para verificar el grado de desinfección de las instalaciones, tras el proceso de higienización, son aquellas que se realizan mediante la toma de muestras con placas de contacto y el escobillonado o hisopado de las superficies higienizadas. Estos métodos reflejan si quedan restos de contaminación microbiana una vez se ha desinfectado una zona. Sin embargo, en este caso siempre es aconsejable realizar dos muestreos, antes de la desinfección y después de la misma con el fin de averiguar realmente la efectividad del desinfectante.

Las placas de contacto como las **placas Rodac**, en general, no son las más adecuadas para la evaluación de la eficacia de los desinfectantes puesto que sólo son eficaces en superficies llanas, lisas y con recuentos microbianos bajos, ya que no es posible hacer diluciones. Asimismo, otra desventaja que presenta el método de placa de contacto es que no permite el estudio de los biofilms adheridos a las superficies porque para su determinación es necesario que se produzca la ruptura de su estructura. En cuanto a la técnica de escobillonado su principal problema radica en que hay variaciones individuales en la forma de hisopar la superficie. Debido a ello, no suele ser reproducible, observándose una elevada variabilidad de recuentos por área de muestra. Otro inconveniente que posee la técnica es que los microorganismos adheridos y los biofilms en general, no se recuperan bien con el hisopo, o bien, pueden quedar retenidos en el capuchón y no ser transferidos a los medios de cultivo.

Otra desventaja de las técnicas basadas en la microbiología clásica es la obtención de resultados. Tanto las técnicas de escobillonado como las de aplicación por impresión son lentas debido a su incubación previa a la lectura, los resultados no se obtienen hasta las 48 horas como mínimo. En el caso de resultados no satisfactorios, no es posible adoptar medidas correctoras inmediatas, por lo que, desde este punto de vista, no son útiles para ejecutar el plan de vigilancia del sistema de autocontrol. El sector alimentario es consciente de la importancia que tiene verificar su plan de limpieza y desinfección. Así, dichos programas (POES), se diseñan con el objetivo de reducir, y en algunos casos, eliminar la carga bacteriana y restos de materia orgánica e inorgánica de las superficies alimentarias. De esta forma, se pretende minimizar el riesgo de contaminación cruzada para garantizar un producto seguro y de calidad.

Actualmente, un factor a considerar en el diseño del plan de higienización es la eliminación de unas estructuras denominadas **biofilms**, las cuales, como expresamos anteriormente en dicho capítulo, no se habían tenido en consideración hasta que no se han desarrollado sistemas que permiten realizar su detección. Tanto es así que en los últimos años ha ido creciendo el interés en la investigación, desarrollo y/o mejora de técnicas rápidas, fiables y sencillas para evaluar la contaminación de superficies. Recordemos que los organismos indicadores microbiológicos son una importante herramienta en los programas de monitorización ambiental para controlar las condiciones higiénicas en la producción de alimentos. Reflejan las condiciones microbiológicas generales de los equipos y entornos de producción, aportando información clave para validar y verificar los procesos de limpieza e higienización.

El término **"organismo indicador microbiológico"** se refiere a un organismo o grupo de *organismos, que reflejan la condición microbiológica general de un alimento, un equipo o un entorno de producción. Su presencia no proporciona información sobre la posible presencia o ausencia de un patógeno específico ni aporta una evaluación del riesgo potencial para la salud pública. Sin embargo, los datos de los programas de monitoreo ambiental en la industria alimentaria que incorporan organismos indicadores son muy útiles para:

- Determinar el estado higiénico de los equipos y entornos de producción
- Entender la ecología microbiana del entorno de producción
- Validar y/o verificar los sistemas de limpieza e higienización
- Verificar el sistema de control del proceso de producción
- Evaluar el riesgo de contaminación posterior al procesamiento.

Organismos indicadores y su importancia en el entorno de elaboración de alimentos

Los organismos indicadores se utilizan en la microbiología alimentaria desde hace décadas, ya que aportan una visión más amplia de la presencia de microorganismos en ingredientes, productos y entorno, que los análisis realizados a la busca de organismos específicos. El enfoque en el que se basa el uso de organismos indicadores es considerar que, si el proceso de fabricación está realmente bajo control, el número de organismos indicadores también estará bajo control. Los organismos indicadores que se pueden usar para los programas de monitoreo ambiental incluyen los que se encuentran en las pruebas de recuento total de aerobios, coliformes y enterobacterias.

Recuento total de aerobios (APC)

Es una de las pruebas con indicadores más utilizada. Aunque existen métodos con ligeras diferencias, todos tienen en común el uso de un medio nutriente no selectivo, incubado en condiciones aeróbicas, utilizado para la enumeración. La finalidad del método es proporcionar información sobre la población total de bacterias presentes, capaces de crecer en presencia de oxígeno a temperaturas mesófilas (25-40ºC). El APC proporciona información sobre la población microbiana total en una superficie o muestra, que puede utilizarse con diversos fines, por ejemplo, el número total de microorganismos puede afectar tanto a la calidad como al riesgo de deterioro de un producto determinado. Y, más específicamente, el APC es un método extremadamente valioso para validar y verificar procedimientos de higienización. Los recuentos por encima de un cierto umbral sugerirían que la higienización de un entrono o un equipo específico no ha sido efectivo o no se ha realizado de manera adecuada.

Coliformes

Los coliformes son un grupo de bacterias gramnegativas, no formadoras de esporas, fáciles de cultivar e identificar, que se definen por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y/o dióxido de carbono gaseoso. Tradicionalmente, las pruebas de coliformes derivan de la búsqueda de *E. coli* y durante mucho tiempo se ha pensado que la presencia de coliformes indicaba contaminación fecal. Sin embargo, décadas de investigación con respecto a este grupo diverso de bacterias indican que solo una fracción son de origen fecal, mientras que la mayoría son contaminantes ambientales. Las pruebas de coliformes se usan como indicador de una limpieza inadecuada, condiciones insalubres o contaminación posterior a las etapas de procesado. La presencia de coliformes en productos acabados normalmente indica una fuente de contaminación ambiental, posterior a los puntos críticos de control del proceso, normalmente los puntos de aplicación de temperatura, o un fallo en el propio sistema de puntos críticos de control. Una presencia elevada de coliformes en la monitorización ambiental también puede, en ocasiones, desencadenar pruebas adicionales de seguimiento de patógenos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que este tipo de pruebas sólo detectan un subconjunto de los organismos que pueden estar presentes en una planta de procesado de alimentos. Por ejemplo, miembros del género *Pseudomonas*, que representan organismos importantes de deterioro para diversos alimentos, no se detectan con las pruebas de coliformes. Por este motivo, es recomendable combinar las pruebas de coliformes con otros tipos, como la APC.

Enterobacterias

Las enterobacterias representan un grupo diverso de bacterias gramnegativas, que incluyen a los coliformes. A pesar de que incluyen géneros considerados patógenos, como la Salmonella, se las considera un indicador y no un método para monitorizar la presencia de patógenos. En caso de ser necesaria información sobre la presencia o ausencia de un patógeno específico, se recomienda realizar una prueba específica para ese organismo en lugar de confiar en las pruebas indicadoras. Las pruebas de enterobacterias, se usan como indicador de una limpieza inadecuada, condiciones insalubres o contaminación después del procesado.

¿Dónde tomar las muestras?

El primer paso para seleccionar los lugares donde tomar las muestras para el monitoreo ambiental es mapear el proceso de fabricación e identificar los pasos de procesamiento (llenado, congelación, rebanado), las unidades funcionales (líneas de procesamiento) y los equipos, con los materiales de construcción utilizados. La selección de puntos de muestreo debe enfocarse en zonas diferenciadas: **Zona 1** (superficies de contacto con el producto) y **Zona 2** (superficies adyacentes a las superficies de contacto del producto), ya que las pruebas de indicadores en estas áreas proporcionan el mayor valor, en términos de efectividad de saneamiento. El muestreo durante el proceso productivo en puntos de la zona 1 proporciona datos que se pueden usar para detectar una posible pérdida del control del proceso o condiciones que pueden conducir a la contaminación del producto. También se puede usar para definir los tiempos adecuados de ejecución para las diferentes líneas de procesado, y para apoyar la seguridad de los procesos con tiempos de ejecución prolongados.

Además, las pruebas de indicadores en puntos de ambas zonas 1 y 2 representan un método complementario para monitorear las condiciones de los equipos y establecer la frecuencia de mantenimiento preventivo y/o reparaciones. Por ejemplo, las tendencias hacia un mayor número de organismos indicadores en ciertos sitios pueden apuntar hacia la necesidad de un reemplazo (más frecuente) de juntas u otras piezas de caucho y plástico. Cuando se evalúan las fuentes de niveles elevados de organismos indicadores, también es importante tener en cuenta cualquier actividad atípica que pueda estar ocurriendo en las instalaciones, como las obras, la elaboración de nuevos productos en una línea adyacente o los cambios en productos químicos y/o en el personal de saneamiento.

Frecuencia de muestreo y cantidad de muestras

La frecuencia de muestreo debe estar **basada en el riesgo**, dependiendo de factores como el tipo de producto que se esté produciendo (listo para el consumo, listo para cocinar, crudo, etc.), de la susceptibilidad microbiana del mismo, de la carga microbiana de los ingredientes, del nivel de riesgo durante cada paso del procesado y otras consideraciones específicas del entorno de producción, como por ejemplo la letalidad del proceso de producción, la frecuencia del saneamiento o el potencial de contaminación cruzada. En todo caso, un enfoque basado en la selección de muestras tomadas según el riesgo, debe permitir comprobar sólo una parte de los puntos de muestreo disponibles en la zona y aun así debe ser posible verificar el control del entorno o los procedimientos de higienización.

Cuando se utiliza para verificar la eficacia de la higienización, el muestreo debe realizarse después de cada ciclo de saneamiento y antes de la puesta en marcha de la producción, para poder evaluar la tendencia de los resultados y para la identificación temprana de problemas. Si el equipo de producción es complejo o contiene áreas de difícil acceso, también puede ser útil tomar muestras mientras el equipo está funcionando, pero antes de comenzar el procesamiento de los alimentos.

Ciertos equipos (por ejemplo, las cintas transportadoras) deben funcionar durante un cierto período de tiempo (por ejemplo, 15 minutos) antes del muestreo. Esto aumentará la probabilidad de que las poblaciones microbianas residuales que han quedado después de la higienización se vuelvan accesibles al muestreo. Para cada punto de muestreo se deben establecer límites aceptables de organismos indicadores. Estos límites se pueden determinar de varias maneras, ya sea mediante niveles de referencia o utilizando el histórico de datos disponibles.

Después de la higienización, se considera que el nivel de organismos indicadores en las superficies debe ser bajo. Si los resultados están fuera de estos límites especificados, puede ser necesario implementar medidas correctivas. Las desviaciones significativas deben llevar a una reevaluación del plan de muestreo y de la recolección de muestras. Una vez implementadas las acciones correctivas, debe realizarse un muestreo adicional en ubicaciones estratégicas del área donde se ha detectado el problema, para garantizar la efectividad de las mismas. En otras zonas o líneas donde existen condiciones o riesgos similares, es recomendable aplicar también las acciones correctivas efectivas.

Resumiendo lo anteriormente expresado entonces, la industria o empresa de alimentos, debe disponer de un programa de POES implantado y validado, que asegure:

a) Higiene general: Con actividades de seguimiento y vigilancia, realizando controles preoperativos diarios para garantizar un estado de limpieza adecuado de los equipos antes del inicio de la actividad productiva y, en su caso, durante las paradas de producción a lo largo de la jornada (ej. cambios de turno). El control se hará mediante:

- ✓ Una **inspección visual** de todos los equipos e instalaciones a fin de detectar residuos de suciedad y/o productos de limpieza y deficiencias en las condiciones generales de los equipos, que puedan afectar a la eficacia de la L+D (grietas, presencia de óxido, piezas dañadas).
- ✓ La aplicación de **técnicas analíticas adicionales** en localizaciones estratégicas (nivel alto de riesgo, dificultad de acceso de los productos de limpieza, alta probabilidad de formación de biofilms).

b) Contaminación microbiológica: Estableciendo controles rutinarios con la periodicidad definida en el plan de muestreo para comprobar la eficiencia de las operaciones de L+D, así como también, detectar y corregir focos potenciales de contaminación microbiológica:

- ✓ Recuentos de microorganismos indicadores: Bacterias aeróbicas totales, enterobacterias, coliformes, *Escherichia coli*.
- ✓ Detección y/o recuento de patógenos específicos: *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus aureus.*

c) Límites críticos: En superficies de contacto con alimentos y control de microorganismos indicadores (Zona 1). Como criterio general, para resultados del recuento de bacterias aeróbicas totales y enterobacterias, el ICSMF nos brinda como referencia:

Contaminantes y valores	Valores aceptables	Valores inaceptables
Bacterias aeróbicas totales	0-10 ufc/cm^2	> 10 ufc/cm^2
Enterobacterias	0-1 ufc/cm^2	> 1 ufc/cm^2

La industria puede establecer varios **niveles de exigencia** a aplicar en diferentes clases de superficies. El nivel de exigencia se debe corresponder siempre con los resultados de la clasificación del **nivel de riesgo** de las superficies (más estricto para superficies con nivel de riesgo más alto), a saber:

Nivel exigencia	Higiene	Bacterias aeróbicas ufc/30 cm^2	Coliformes ufc/20cm^2	Hongos y levaduras * ufc/30cm^2
Bajo	Buena	≤ 50	< 1	≤ 3
	Aceptable	50 - 150	1 - 5	3 - 50
	Deficiente	> 150	> 5	> 50
Normal	Buena	≤ 20	< 1	≤ 1
	Aceptable	20 - 100	1 - 3	1 - 30
	Deficiente	> 100	> 3	> 30
Estricto	Buena	≤ 15	< 1	≤ 1
	Aceptable	15 - 50		1 - 20
	Deficiente	> 50	≥ 1	> 20

*** Los recuentos de hongos se utilizan como indicadores de zonas con posibles problemas de humedad o de excesiva contaminación ambiental (aire)**

El criterio a aplicar por lo que se refiere a los resultados de los análisis de detección de *Salmonella*, *Listeria* u otros patógenos en superficies limpias y desinfectadas debe ser siempre **ausencia**.

►Métodos de referencia

- **Detección de *Salmonella*: ISO 6579**
- **Detección de *L. monocytogenes*: ISO 11290-1**
- **Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva: ISO 6888-1, 2 y 3**
- **Recuento total de bacterias aeróbicas mesófilas viables: ISO 4833**
- **Recuento de enterobacterias: ISO 21528-2**
- **Recuento de coliformes: ISO 4832**

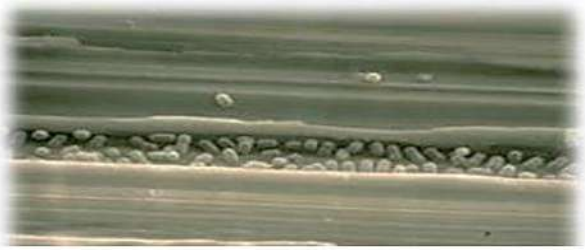
Programa de muestreo: Criterios de clasificación del nivel de riesgo de las superficies:

Nivel de riesgo	Descripción superficies
Alto	**Mesas de manipulación, cintas transportadoras, recipientes o contenedores, tanques de escaldado, equipos de procesado, herramientas y utensilios de trabajo, guantes y delantales, estructuras suspendidas que puedan gotear sobre el alimento o superficies de contacto**
Medio	**Tapaderas y superficies externas de contenedores, equipos y conducciones**
Bajo	**Suelos, paredes, techos, puertas****

****Para los programas específicos de control de *Listeria monocytogenes* se deben considerar superficies de riesgo aquellas que pueden actuar como nichos del patógeno, aunque no tengan contacto directo con los alimentos**

Las soldaduras insalubres no son lavables a nivel microbiológico

Microscopía por barrido electrónico de *L monocytogenes* que crece en el acero inoxidable



Para determinar la localización de los puntos de muestreo considerar como superficies con un nivel de riesgo más elevado las localizadas en:

- zonas donde se realicen actividades más sucias (considerar más críticas las que se encuentran relativamente cercanas a áreas limpias)
- las zonas mojadas y/o con drenajes abiertos (*versus* las zonas secas)
- las zonas de procesado con temperaturas más elevadas (*versus* las salas refrigeradas)
- las áreas con un nivel más alto de actividad de operarios

- las zonas donde se manipulen materias primas o alimentos no procesados
- las áreas de posprocesado (donde se realizan etapas posteriores a la aplicación de un tratamiento letal) y de envase (posibilidades de recontaminacion)

Número de muestras y frecuencia de muestreo

- En promedio y de acuerdo a la industria, se estima recoger entre 10-30 muestras de cada línea de producción, con un mínimo de 5 muestras en establecimientos con volumen de producción bajo, cada dos semanas.
- En promedio también, 2/3 de las muestras deben corresponder a superficies con nivel de riesgo alto, que contacten directamente con los alimentos.
- Establecer una pauta de rotaciones de los puntos de muestreo que garantice que en un mes se controlen todas las superficies. Conviene ir alternando el día o los días de la semana en los que se realiza el muestreo.
- Registrar los resultados de los controles para que se puedan visualizar y analizar las tendencias y actuar en consecuencia si se observa una tendencia hacia resultados no satisfactorios.
- Se puede adaptar (intensificar o reducir) la frecuencia de muestro y/o modificar los puntos de recogida de muestras basando las decisiones en los resultados reflejados en el registro histórico.

Métodos de análisis

Para continuar con el tema anterior, para las superficies, se pueden utilizar escobillones/esponjas estériles y métodos de contacto directo con Agar (placas RODAC o laminocultivos) (**ISO 18593-2004**). Las placas mencionadas, se manejan de la siguiente manera:

- ✓ sólo se pueden utilizar en superficies limpias y secas, llanas, lisas y suficientemente anchas
- ✓ se debe presionar la placa, que contiene el medio de cultivo adecuado al tipo de determinación que se quiere realizar, asegurando el contacto entre toda la superficie del agar y la superficie de muestreo los medios deben contener agentes neutralizantes de los productos de L+D utilizados: (Tween 80 (30g/L) y lecitina (3 g/L); Tiosulfato sódico (5 g/L), L-Histidina (1 g/L), saponina (30 g/L).

- ✓ no es necesario mantener las placas en refrigeración durante el traslado al laboratorio

INTERNATIONAL STANDARD ISO 18593

First edition 2004-06-01

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

Microbiologie des aliments — Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons

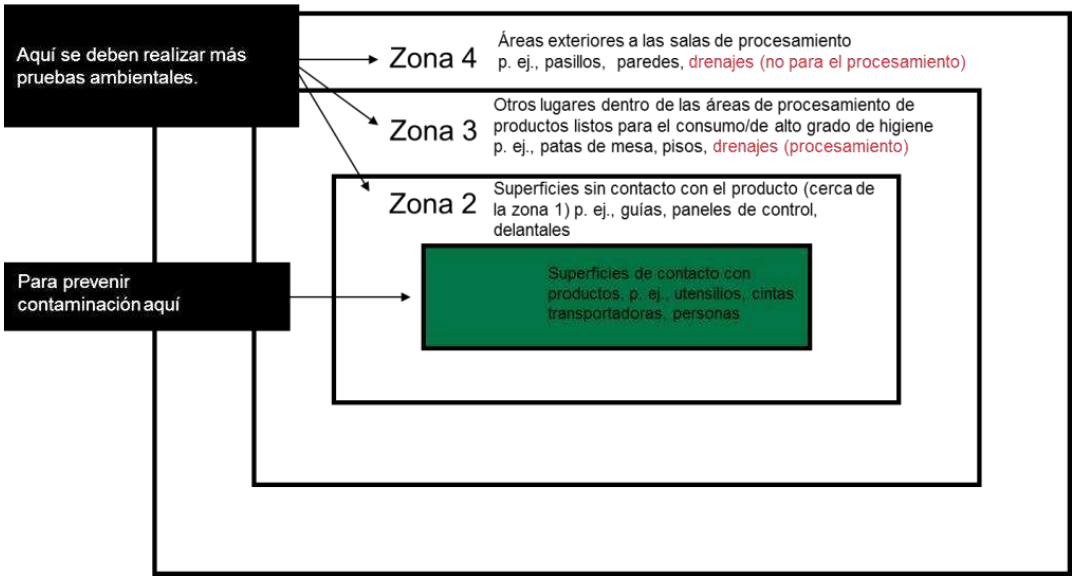
Los elementos clave si se utilizan **escobillones/esponjas** son:

- ✓ humedecerlos con soluciones que preserven la integridad de la muestra hasta el momento del análisis (1 g/L peptona, 8,5 g/L cloruro sódico)
- ✓ si se muestrean superficies limpias y desinfectadas las soluciones de han de contener neutralizantes de los productos utilizados en las operaciones de L+D
- ✓ aplicar un poco de presión e ir girando el escobillón/esponja. Primero hacia una dirección, pasando por toda la superficie, después repetirlo en la dirección perpendicular y una tercera vez en diagonal
- ✓ una vez recogidas las muestras, los escobillones/esponjas deben conservarse húmedos en un recipiente estéril, a temperatura <8ºC durante el transporte, y entre 1 y 4ºC hasta el momento del análisis, que debe realizarse antes de 24 h (máximo 36 h)
- ✓ el área muestreada debe ser, siempre que sea posible, como mínimo de 100 cm^2. Para áreas grandes es más práctico utilizar una esponjita que un escobillón. Se puede utilizar una plantilla limpia y esterilizada para delimitar el área

Si se ha muestreado con **escobillones**:

- ✓ Agitar vigorosamente el tubo que contiene la suspensión de microorganismos recogidos con el escobillón
- ✓ Realizar un banco de diluciones decimales (solución 1 g/L peptona, 8,5 g/L cloruro sódico)
- ✓ Sembrar las diluciones oportunas en placas con el medio de cultivo adecuado al tipo de determinación que se quiere realizar

- ✓ Incubar las placas sembradas y/o las de contacto directo, en las condiciones adecuadas.
- ✓ Hacer el recuento de las colonias presentes en cada placa (ufc) y calcular la media de las que correspondan al mismo punto de muestreo
- ✓ Expresar los resultados en **ufc/cm²** o en **ufc/unidad de muestreo** (si se han investigado utensilios o superficies irregulares de área no delimitada).

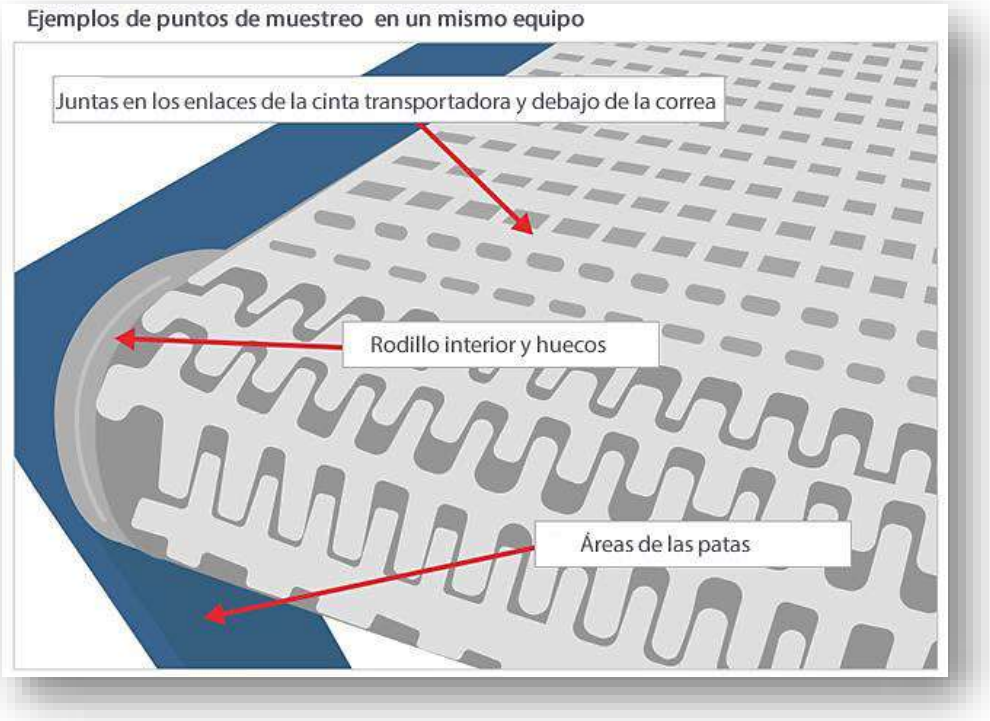


	Descripción	Ejemplos
Zona 1	Superficies de contacto con producto	Cabezales de llenado, tolvas, espátulas, utensilios, superficies de equipos de empaquetamiento, bandas transportadoras de contacto con producto, salmuera
Zona 2	Superficies sin contacto con producto cercanas a la Zona 1 que, si se contaminan, pudiesen razonablemente contaminar las superficies de contacto con producto a través del funcionamiento normal	Sitios cercanos a la Zona 1 que pudiesen incluir: elementos por encima del producto expuesto, guías de empaquetamiento, patas de equipos, estructuras, cubiertas de motores, tapas de tanques, paneles de control, carritos de desechos, bandas transportadoras, respiraderos de HVAC, filtros de aire, tapetes del piso en el empacado
Zona 3	Otras ubicaciones dentro de las áreas de procesamiento de productos RTE o de alto grado de higiene. Muy poca posibilidad de contaminar el producto o las superficies de contacto con el producto utilizando prácticas normales sin intervención mecánica o humana	Pisos, paredes, superficies, uniones entre pared y piso, herramientas de limpieza (escobas, jaladores), cepillos para piso, montacargas, drenajes de piso, drenaje pluvial del techo, estaciones de lavado, áreas de almacenamiento de ingredientes, salas de transición, etc. de las salas de procesamiento de productos RTE o de alto grado de higiene.
Zona 4	Áreas exteriores a las salas de procesamiento	Almacenes, laboratorios, casilleros, salas de descanso, áreas del compactador, oficinas, talleres de mantenimiento

Adaptado de la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF - 2015)

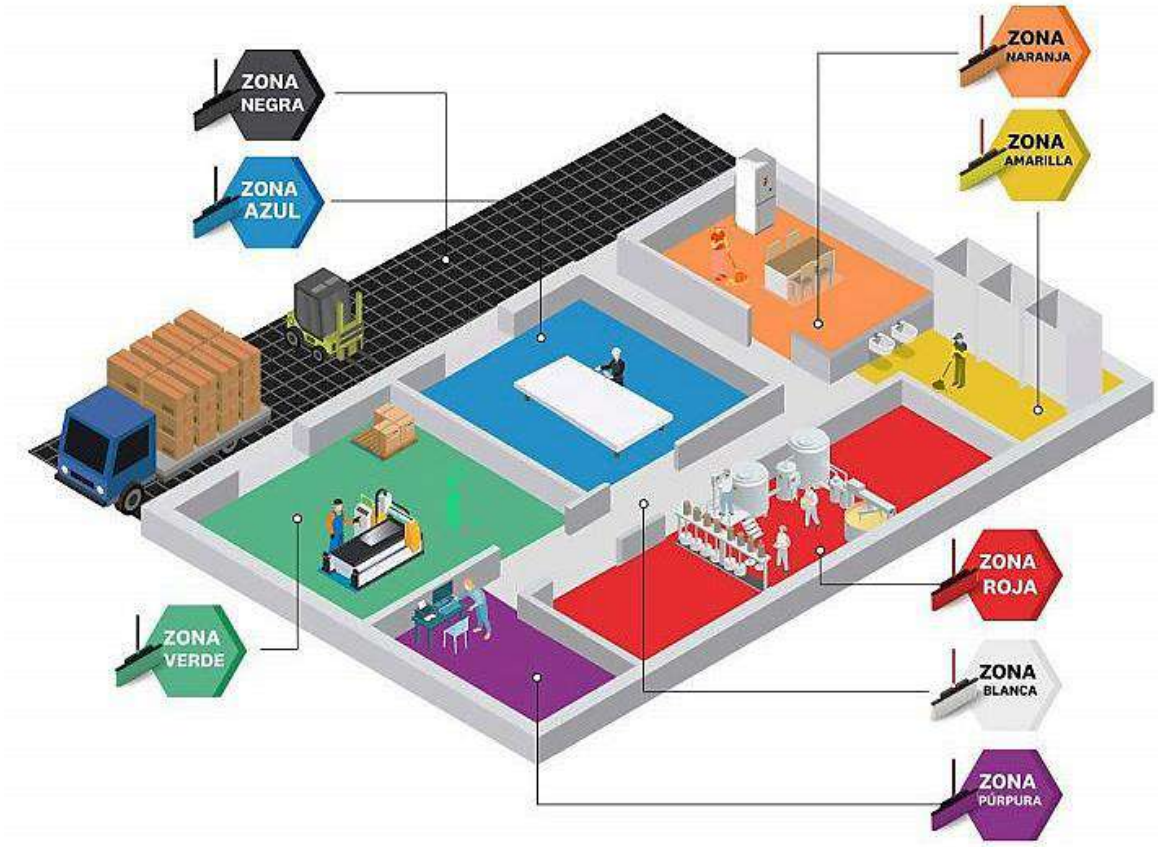
Como ya vimos, un plan de muestreo debe ser dinámico y robusto, y debe incorporar sitios fijos, rotativos y aleatorios en cantidades planificadas que tomen en cuenta los riesgos tales como la mezcla de producto crudo con producto RTE, la antigüedad y estado de la instalación y equipo, antecedentes y tipo de producto. Entre las consideraciones y plan de muestreo se encuentran:

- El **muestreo de rutina** se concentra en las Zonas 2 y 3 para obtener un indicio rápido de la presencia de *Listeria spp* en el ambiente.
- Las áreas tradicionalmente vinculadas con el desarrollo de *Listeria spp* (cilindros huecos en cintas transportadoras, material de junta alrededor de las puertas, estructuras huecas de apoyo, cortadoras, rebanadoras, bandejas recolectoras, condensado) deben incluirse preferentemente en el plan.



- Atención a las áreas más críticas de la planta, incluyendo las áreas entre la etapa de eliminación o reducción microbiológica y el empaquetamiento final.
- Revisar las interconexiones, las áreas de transición y las barreras entre las áreas de producto crudo y de producto RTE, para verificar la eficacia de la separación.
- El personal que realiza el muestreo debe tener libertad para tomar muestras de otros sitios, según sus observaciones.
- El muestreo de la Zona 4 es menos frecuente, se usa para determinar la presencia de microorganismos transitorios que pudiesen suponer un posible riesgo a las áreas de producto RTE, o para fines de investigación. El muestreo de áreas ajenas a la producción y áreas de transición también puede ayudar a evaluar la eficacia de los controles preventivos.
- Un equipo interdisciplinario de inocuidad alimentaria, familiarizado con los programas, procesos y prácticas de la planta, es el más adecuado para elaborar una lista de los sitios de muestreo.

- Mapear el sitio para identificar: distribución de la instalación, el flujo de tránsito y la designación de las zonas higiénicas y así ayudar a determinar la selección de los lugares de muestreo (Layout).
- Hacer el análisis y encontrar *Listeria spp* en una superficie de contacto con el producto no significa automáticamente que el producto esté contaminado. Sin embargo, se debe determinar el destino de productos que hayan estado posiblemente expuestos, tomando en cuenta la probabilidad de transferencia, la capacidad del producto para promover el desarrollo de la bacteria y el uso previsto del mismo.



El muestreo ambiental de rutina se realiza durante la producción, al menos cuatro horas después del inicio del ciclo de producción. Los ciclos más prolongados de producción pueden requerir que el muestreo se realice más tarde, iniciando al menos a la mitad entre los ciclos de sanitización. Se recomienda este plazo debido a que es posible que los sitios de albergue microbiano no puedan identificarse inmediatamente después de la limpieza y sanitización. Es posible que *Listeria spp* establecida en un nicho desaparezca con la vibración y la humedad a medida que se ponga en funcionamiento el equipo. Algunas muestras solamente pueden obtenerse de forma segura cuando el equipo no está funcionando; estas muestras pueden obtenerse al final de la producción, antes de la limpieza, o en cualquier otro momento en que el equipo esté inactivo, y se pueda tener acceso al mismo de manera segura. El muestreo de rutina debe realizarse con una frecuencia mínima (p. ej., diariamente, semanalmente, quincenalmente), según las condiciones particulares de la instalación, las circunstancias y los antecedentes. Los plazos deben alternarse para garantizar que se monitoreen las situaciones en todos los días, turnos, áreas de la planta y zonas.

La modificación de los plazos para representar todo el programa de producción y registrar eventos que solo sucedan de forma periódica, ayudará en la investigación de cualquier problema. Algunos sitios de la Zona 4 solamente podrán muestrearse mensual o trimestralmente.

Para **muestreo no rutinario, de investigación o por eventos especiales**, los plazos se determinan según las circunstancias específicas. Tomar muestras cuando las condiciones no sean habituales, tal como durante auditorías, visitas, construcción. Tome muestras siempre que suceda un desbordamiento de drenajes o filtración del techo. Asimismo, debe haber un proceso para el muestreo de todos los equipos nuevos que ingresan, y un muestreo previo y posterior a las construcciones. Además de los sitios de muestreo rutinario, también constituye una buena práctica realizar algunos muestreos aleatorios como control adicional para comprobar que los programas de control de patógenos de la instalación funcionan como se esperaba.

La cantidad de muestras obtenidas variará según la zona, el riesgo para producto expuesto y la complejidad del sistema de producción. La cantidad total de muestras obtenidas cada semana es específica para la instalación y el producto. Las consideraciones incluyen, pero no se limitan a:

- Tamaño de la instalación: algunas empresas usan un lineamiento general de 1 muestra/80 m^2 /semana.
- Condiciones de proceso: nivel de exposición del producto RTE al ambiente de la planta, manipulación humana antes del empacado, temperatura del producto al momento del empacado (llenado en caliente vs. llenado en frío).
- Evaluación de riesgo del producto: ¿el producto promueve la supervivencia o desarrollo de patógenos?
- Condición de la instalación de procesamiento: piso, áreas elevadas, condiciones de las paredes, antigüedad, flujo del producto. Condiciones sanitarias del equipo de procesamiento: soldaduras, grietas, picado, material de fácil limpieza, etc.
- Información externa de antecedentes y brotes recientes: normas de monitoreo ambiental de la industria, inquietudes recientes acerca del producto o ingredientes, perfil de riesgo inherente al tipo de producto, etc.
- Otros factores: condiciones de distribución, vida de anaquel, uso previsto, canal de distribución previsto, si el producto va dirigido a consumidores de alto riesgo (jóvenes, adultos mayores, mujeres embarazadas, inmunocomprometidos).
- Flexibilidad: el plan debe incorporar objetivos de rutina, así como de investigación, validación y verificación.

El personal capacitado de la planta debe obtener las muestras de forma aséptica utilizando prácticas higiénicas de manipulación, asimismo, las personas que tomen muestras deben avanzar desde las áreas **limpias** hacia las de menor nivel de higiene, para evitar la contaminación cruzada de la instalación. Esto significa que el muestreo de las superficies de contacto con producto (PCS) de la Zona 1 se realizan antes del muestreo de superficie que no sean PCS, y los de áreas de producto RTE antes de las áreas de producto no RTE.

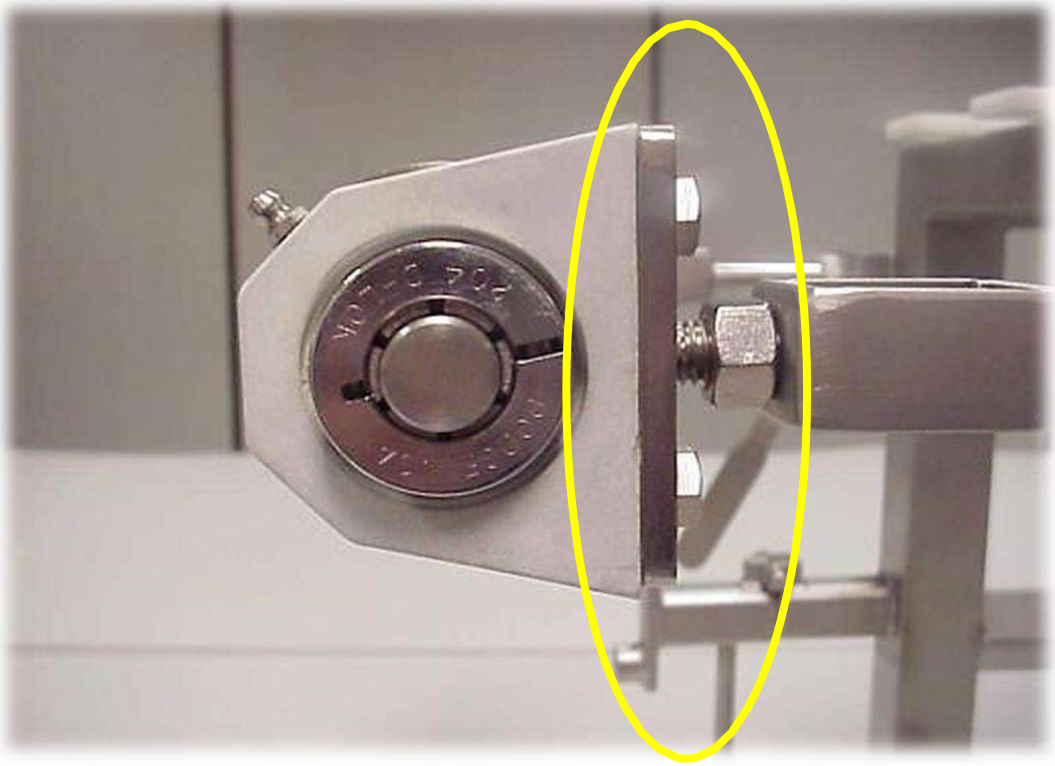
Las esponjas esterilizadas son eficaces para tomar muestras de áreas amplias (25 x 25 cm), mientras que se pueden usar hisopos más pequeños para áreas pequeñas o de difícil acceso. Se deben humedecer las esponjas y los hisopos con una solución amortiguadora adecuada. Si hay restos de limpiadores o desinfectantes en los sitios de muestra, se debe usar una solución amortiguadora que tenga un agente neutralizante como ya vimos.

Se debe utilizar una esponja o hisopo separado para cada sitio distinto. Para las esponjas, tomar una muestra de un área tan amplia como sea posible usando un frotamiento firme o abrasión para aumentar la posibilidad de encontrar organismos donde se hayan establecido biofilms. Para tuberías extensas o ensamblajes inaccesibles, una práctica aceptable es enjuagarlos con una solución amortiguadora y luego analizar la solución. El combinar varias muestras para ser analizadas como una sola (**muestra compuesta o pool**) con el fin de reducir los costos del análisis solo se debe considerar en programas establecidos, en los que los resultados positivos son inusuales. La combinación de muestras puede ocasionar un retraso o confusión en las acciones correctivas. Se pueden combinar hasta cinco esponjas distintas en un pool para la prueba. No combinar muestras de zonas distintas. No se debe realizar la combinación de muestras durante una investigación. En caso de haber un resultado dudoso a partir de una muestra compuesta, cada sitio individual debe considerarse como sospechoso.

Es fundamental que el laboratorio de pruebas y análisis esté acreditado y sea confiable para realizar los estudios deseados. Se recomienda que el laboratorio esté acreditado por las normas ISO 17025 o tenga un sistema de control para abordar los aspectos básicos de un laboratorio acreditado o BPL: Aptitud del personal y capacitación documentada; métodos de prueba documentados y fundamentados en normas aceptadas; equipo apto para el propósito y calibrado adecuadamente y programa documentado de aseguramiento de la calidad que incluya pruebas de competencia, entre otros ítems.

Los resultados deben revisarse tan pronto como sea posible después de recibirlos. Se recomienda el uso de un mapa de la instalación para indicar dónde se encuentran los sitios de muestreo, así como dónde se obtuvieron resultados positivos. El mapeo brinda una representación visual de los sitios respecto al equipo, rutas de tránsito y áreas de convergencia, y pueden ayudar a identificar patrones que no son visibles de otra manera y deben de indicarse siempre la hora del muestreo para identificar los turnos, antes/después de la sanitización. Para comprender mejor el concepto, daremos un ejemplo práctico:

Eliminación de un nicho de desarrollo: *Durante un muestreo de rutina en una sala de procesamiento, una muestra del piso debajo de una banda transportadora y cerca de un detector de metales produjo un resultado presunto positivo para Listeria spp durante la producción. El equipo de inocuidad alimentaria realizó muestreos de investigación inmediatamente después, en las secciones cercanas del piso, la estructura del equipo, patas, protectores y ejes. Los muestreos de investigación se realizaron después de la limpieza y durante producción. Todos los muestreos posteriores a la limpieza produjeron resultados negativos, salvo uno cercano a una carcasa de un eje. Durante la producción, otros sitios adyacentes a la carcasa del balero también dieron un resultado positivo. La imagen nos muestra una junta empalmada formada por la carcasa del eje y la estructura o marco del equipo, donde Listeria spp había establecido un nicho y la estructura se había oxidado.*



El personal de mantenimiento desarmó la carcasa y notó la presencia de óxido en la misma, y en la estructura. Sustituyeron la carcasa y solicitaron al personal de sanitización limpiar y sanitizar (con amonio cuaternario) la estructura. Para verificar la eficacia de sus medidas, se tomaron muestras de la carcasa nueva y de la estructura sanitizada para detectar Listeria spp. Los resultados fueron negativos en la nueva carcasa, pero fueron un presunto positivo en la estructura.

El personal de mantenimiento retiró la carcasa y usó otro tipo de desinfectante (a base de alcohol). Aun así, el muestreo arrojó un resultado presunto positivo para Listeria spp. En ese momento, el personal de mantenimiento decidió eliminar todo el óxido de la estructura puliéndola y sanitizándola. Después de tomar estas medidas, los resultados fueron negativos para Listeria spp en todas las superficies adyacentes a la carcasa, incluyendo el piso. Este caso práctico evidencia la importancia del muestreo vectorial para identificar un nicho, así como la importancia de verificar la eficacia de las medidas tomadas.

El objetivo es valorar la posibilidad de contaminación por *Listeria* con la planta en funcionamiento y en superficies ya usadas o utilizándose, además de procurar la detección y eliminación de cepas persistentes o, en caso de que la eliminación no sea posible, el establecimiento de medidas correctivas orientadas a evitar la contaminación de los alimentos por estas bacterias. Se trataría fundamentalmente de superficies de contacto directo y son muestras operativas. En los dos momentos en que se realice la toma de muestras (preoperativo u operativo), es recomendable solicitar identificación de *Listeria spp* y *Listeria monocytogenes* porque la detección de cualquier cepa no patógena de *Listeria* supone activar las medidas correctoras, ya que la aparición de contaminación por la especie patógena puede ser inminente al compartir los mismos nichos y tener similares características en cuanto a ecología microbiana. Estas dos determinaciones cualitativas, persiguen detectar la presencia del patógeno o del indicador y son mucho más apropiadas que realizar recuentos de *Listeria* en una superficie determinada. Los contajes dependiendo de la presencia de biofilms y con la sabida distribución irregular de la contaminación aportan resultados altamente variables. Las superficies a muestrear conviene que sean lo más amplias posible.

La autoridad competente, podrá decidir realizar una o ambas determinaciones, porque la reglamentación no habla más que de *Listeria monocytogenes* como especie patógena. No obstante, cabe indicar en este punto, que con la misma técnica analítica y un incremento de costes razonable pueden tener ambos resultados porque los primeros pasos del método son comunes si se utiliza la norma ISO 11290-1. La presencia de biofilms supone un fallo continuado de limpieza, ya que indican que hay zonas que no se limpian, no se aplica el procedimiento correctamente o son zonas de difícil acceso al detergente y/o biocida. Estos fallos de limpieza deben corregirse y los biofilms eliminarse antes de realizar un muestreo para verificar la adecuada limpieza y desinfección. En ocasiones, los biofilms no se detectan fácilmente y, por ello, puede ser conveniente utilizar detectores de biofilms en superficies.

Se verificará que la empresa lleva a cabo las medidas correctoras que tiene establecidas ante la presencia de *L. monocytogenes* en sus muestras de superficies y que además comprueba la eficacia de estas medidas. La autoridad competente, al verificar la aplicación de estas medidas, valorará si la seguridad alimentaria del producto está garantizada. Si, a su juicio, las medidas adoptadas por el operador no garantizan la seguridad del producto, o se constata que el operador no ha tomado las medidas contempladas en su sistema de autocontrol, podrá tomar otras medidas, que podrán incluir la rigurosa identificación del producto afectado, la retención voluntaria, la inmovilización cautelar y la toma de muestras oficial del producto sospechoso de estar contaminado.

Aquellos lugares de difícil acceso, como pueden ser orificios o grietas en equipos hechos con materiales fibrosos, porosos, oxidados o huecos que no pueden limpiarse fácilmente son potenciales lugares donde puede albergarse la bacteria y de donde deben tomarse muestras. Puede resultar difícil tomar muestras de zonas inaccesibles, en las que se acumulan restos de alimentos. Para ello, las muestras se deberán tomar tras desmontar los equipos junto con los profesionales de mantenimiento. En estas zonas, no se recomienda tomar muestras mediante enjuagado, ya que esta técnica no es tan eficaz como el frotado a la hora de adherir los microorganismos presentes en las superficies. Se deben recoger muestras con frecuencia de zonas en las que los productos alimenticios están expuestos a contaminación, aunque puede resultar interesante tomarlas también, con menor frecuencia, de aquellas en las que no están expuestos (zonas de almacenamiento). La selección del punto de muestreo debe basarse en el historial de cada fábrica tras la revisión del proceso paso a paso.

La detección de *L. monocytogenes* puede dificultarse si se toman las muestras inmediatamente o poco después de que se haya producido la limpieza y desinfección. Debido a los daños que los agentes químicos utilizados para la limpieza y desinfección producen en las células, estas pueden continuar con vida, aunque no sean cultivables, por lo que no se detectan fácilmente. Además, es posible que no se puedan detectar aquellas células que hayan quedado albergadas en ciertos lugares, a pesar de su limpieza y desinfección. Es más fácil tomar muestras una vez que son desalojadas durante el procesado de los alimentos debido a la vibración de los equipos y/o tras el contacto con alimentos y líquidos. Por lo tanto, para aumentar la probabilidad de detección de una cepa persistente, las muestras se deberán tomar durante el procesado de los alimentos, una vez transcurridas dos horas como mínimo tras la producción o al final de esta fase, es decir, antes de los procesos de limpieza y desinfección.

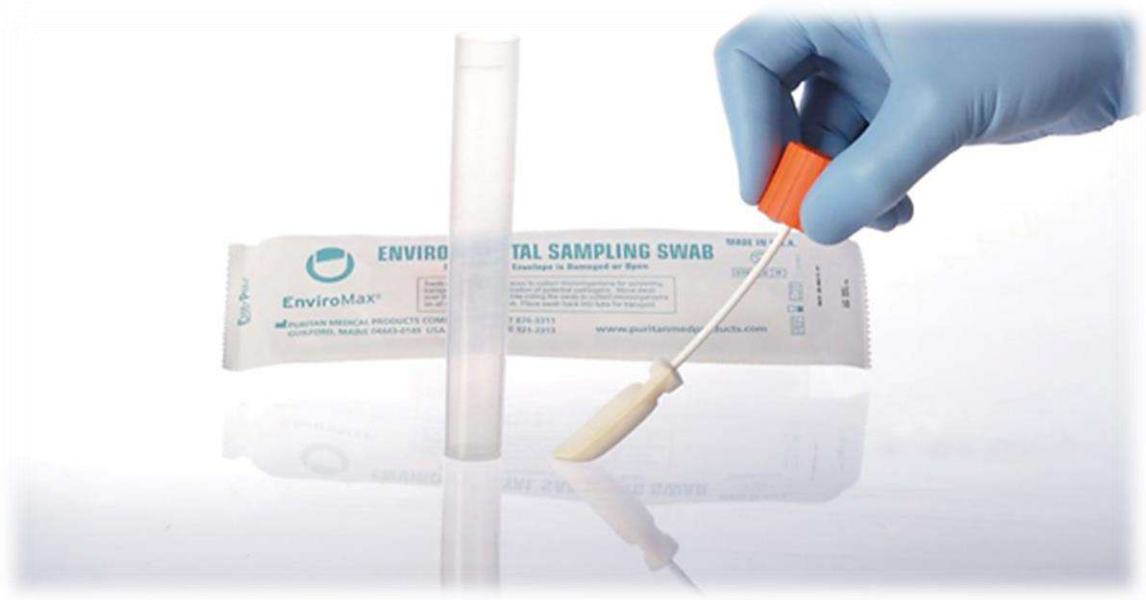
En las líneas de transformación en las que se fabrican productos alimenticios a partir de productos crudos que no han sido sometidos a ningún tratamiento que reduzca los niveles de microorganismos (por ejemplo, quesos crudos), las muestras de las superficies para la detección de L. monocytogenes que se tomen durante la fase de transformación pueden proceder tanto de estos productos crudos como de los lugares en los que las células de L. monocytogenes pueden persistir en el entorno de procesado del alimento. Cuando en las plantas se procesan productos pasteurizados o materias primas que normalmente no están contaminadas (por ejemplo, quesos pasteurizados), en el análisis de L. monocytogenes de una muestra superficial esta debería considerarse como un tipo persistente de Listeria.

Cuando los alimentos llegan a las instalaciones de procesado en estado crudo o tras haber sido sometidos a un tratamiento para la disminución de la carga microbiana (pasteurización, microfiltración), las empresas alimentarias deberían, dentro de su plan de APPCC, definir un número aceptable de muestras positivas, que puede ser diferente para la detección de L. monocytogenes en aquellas superficies que se encuentran en contacto con alimentos de las que no. Cuando se supere el número establecido de muestras positivas, se deberán tomar medidas correctivas en función del plan de APPCC de la empresa alimentaria.

Es evidente que, cuando se procesa un alimento crudo, se pueden tomar muestras tras los procesos de limpieza y desinfección o al inicio de la fase de producción, además de las muestras que se recojan durante su transformación. No obstante, este procedimiento puede dar una falsa sensación de seguridad. Por el contrario, la detección de L. monocytogenes en superficies en contacto con alimentos tras los procesos de limpieza y desinfección es un indicador de la existencia de un fallo grave en tales procesos. En el caso de que no se tomen muestras a diario, no se recomienda que el muestreo tenga lugar siempre el mismo día de la semana. Asimismo, sería recomendable tomar muestras cuando se efectúen tareas de mantenimiento o reparación de equipos, se realicen obras y aumente la producción, ya que son situaciones que pueden aumentar el riesgo de contaminación con L. monocytogenes.

En aquellas zonas de fácil acceso de las que se tomen muestras durante o al final de la fase de transformación, se deberán utilizar diluyentes simples que no contengan neutralizadores para humedecer los hisopos u otros utensilios de muestreo por frotado. Se recomiendan los siguientes diluyentes: solución de peptona en una concentración de 1 g/l, solución de peptona salina o solución Ringer ¼, distribuidas en tubos y esterilizadas durante 15 min a 121 ºC. No se recomienda utilizar diluyentes tamponados de fosfato en caso de células estresadas por las condiciones hostiles de las instalaciones de procesado de alimentos (sal, ácidos, productos de limpieza y desinfección, etc.) debido a que pueden perjudicar su cultivo. Asimismo, tampoco se recomienda utilizar diluyentes neutralizadores cuando no se espera la presencia de residuos de desinfectantes.

Los neutralizadores que se emplean para eliminar residuos de desinfectantes pueden tener leves consecuencias negativas para las células bacterianas y es posible que estas consecuencias sean mayores cuando las células están estresadas. De hecho, se ha demostrado que los neutralizadores reducen las tasas de cepas de Salmonella en las muestras de campo. Por otra parte, se desaconseja utilizar un caldo Fraser (completo o semi) como sustitutivo de un diluyente dado que podría favorecer el crecimiento de L. monocytogenes en la planta de procesado.



Como se muestra en la imagen, cada hisopo o esponja de muestra puede llevarse en un medio especial de transporte ya identificado con el color de la zona muestreada

En el control de higiene de superficies, elegir el sistema de muestreo más adecuado es un factor clave para un correcto análisis. Asegurar una buena recolección bacteriana de forma precisa y/o selectiva es la base que asegura la eficiencia del análisis posterior. La recolección efectiva de muestras ambientales con un dispositivo apropiado es una parte integral de las estrategias de monitoreo ambiental proactivo. Ya que ayudan a prevenir la contaminación microbiana de los productos terminados. La toma de muestras es una etapa crítica en cualquier proceso de análisis. En el caso de la toma de muestras de superficies para control microbiológico, es importante también tener en cuenta otros factores como:

- La posible presencia de biofilms
- El uso de neutralizantes de amplio espectro que puedan inhibir la presencia de restos de desinfectantes

Algo que olvidamos comúnmente es que si el mismo dispositivo de muestreo puede convertirse en un peligro físico, o podemos cuando vayamos a muestrear, dejar algunas partes de forma accidental. O cuando se hace el muestreo el hisopo está hecho de alguna fibra casera, que esto empiece a desprender pequeñas fibras que pueden convertirse en una queja y eso es algo que no buscamos.

En industrias alimentarias, la validación de los procesos de higiene es de vital importancia para garantizar que las superficies en contacto con alimentos se encuentran en las condiciones adecuadas antes de iniciar la producción. Esta validación comprende tanto el control de la presencia de residuos físicos o químicos como microorganismos indeseados. Las técnicas convencionales para el control de la contaminación microbiológica se basan en la recogida de muestras de la superficie, mediante hisopos o toallitas, y su análisis en un laboratorio microbiológico para el recuento de diferentes microorganismos: aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes o microorganismos específicos. Como ya vimos anteriormente, una alternativa a esta metodología es el **uso de placas de contacto**, que contienen un medio de crecimiento selectivo al tipo de microorganismos que se pretenden controlar. El uso de este tipo de placas evita la necesidad de acudir a un laboratorio microbiológico para su procesado. Sin embargo, la eficacia del muestreo es limitada, con lo que el límite de detección es elevado, y se requieren igualmente tiempos de al menos 24 horas para obtener resultados.

El uso de herramientas rápidas para monitorizar la presencia de contaminación microbiológica es, por tanto, una ayuda fundamental para la industria alimentaria. Disponer de resultados en un tiempo corto ayuda a mejorar los procesos de producción y la seguridad de los alimentos producidos, minimizando los tiempos de espera. Una alternativa habitual es el uso de equipos de medición de la **bioluminiscencia de ATP** (que veremos más adelante). Esta técnica es muy sencilla y permite obtener resultados en unos pocos minutos. Sin embargo, no es posible discriminar entre células bacterianas y otras células que también contienen ATP y su valor principal reside en su uso como control higiénico de las superficies. Frente a estas necesidades, en los últimos años se han desarrollado diversas herramientas que utilizan colorantes y distintos mecanismos de actuación para revelar la presencia de contaminación microbiológica en distintas formas.

Estas herramientas comparten su facilidad de uso, ya que se basan en la aplicación de un spray y la observación del color residual o cambios en el color, y la rapidez en la obtención de resultados: desde 30 segundos a pocos minutos (ya vimos a TBF 300 y TBF 300S) para biofilms.

Un desarrollo más reciente es el producto **Fresh Check**, que permite la detección rápida de microorganismos viables en las superficies. Este producto está basado en un complejo que reacciona con microorganismos vivos, dando lugar a un cambio de color apreciable a simple vista. Fresh Check se aplica igualmente en forma de spray sobre las superficies a muestrear y el cambio de color transcurre en tiempos no superiores a 30 segundos. El producto no reacciona con células inactivas y el límite de detección es muy inferior al de las placas de contacto, de manera que Fresh Check constituye una seria alternativa al uso de este tipo de placas para el control microbiológico, ya que los resultados son inmediatos y la sensibilidad mucho más elevada.

Finalmente, otro tipo de productos destinados a esta aplicación son los basados en peróxido de hidrógeno, como es el caso de **CAT+Finder**. El peróxido de hidrógeno se descompone en oxígeno y agua, dando lugar a la formación de pequeñas burbujas que se observan de forma más clara añadiendo un colorante a la solución. Este proceso es más intenso en presencia de microorganismos que contienen catalasa, que actúa como catalizador.

Una gran parte de los microorganismos habitualmente presentes en la industria alimentaria contienen catalasa, de manera que CAT+Finder puede mostrar la presencia de este tipo de microorganismos. La reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno es también catalizada por otros residuos que presentan elevadas cantidades de metales, como por ejemplo la sangre. De esta forma, CAT+Finder es más adecuado para un control genérico de la higiene de las superficies, ya que no permite discriminar entre microorganismos y otros residuos orgánicos.

Las herramientas descritas, suponen un complemento a otras técnicas disponibles para el control higiénico, con el fin de aumentar y extender los parámetros que es posible controlar y contribuir a mejorar la calidad y seguridad de los alimentos. Así, por ejemplo, el uso de TBF 300 y Fresh Check se puede combinar con técnicas convencionales de control microbiológico, de manera que estas técnicas rápidas se empleen para realizar un barrido de las superficies y tomar muestras de aquellos puntos en los que se obtenga un resultado positivo. El análisis convencional de estas superficies permitirá conocer con un mayor grado de detalle las características e intensidad de la contaminación microbiológica detectada. El uso de este tipo de técnicas rápidas es extremadamente útil para la mejora de los procesos de higiene en aquellos casos en los que se detectan problemas de contaminación en los alimentos.

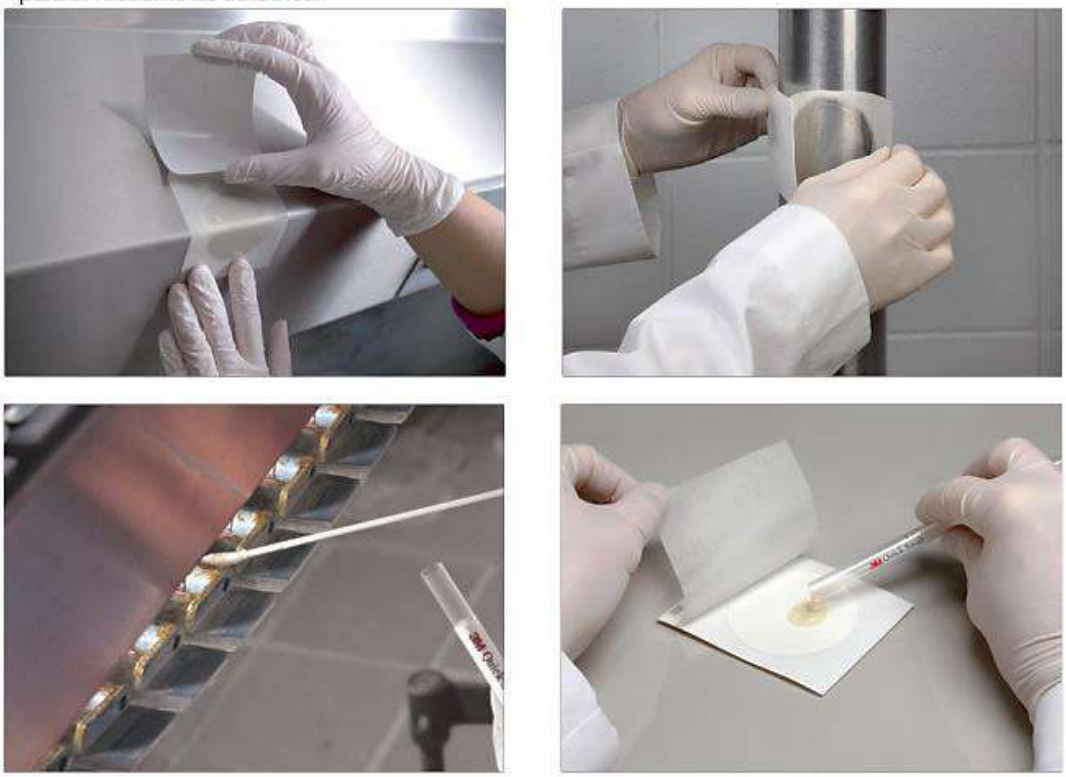
Métodos rápidos

Producto	Objetivos	Cómo medir	¿Se requiere instrumento?	Tiempo de lectura hasta el resultado (TTR)	Conservación del análisis y vida útil
Sistema MVP ICON	ATP, conductividad y concentración, pH, temperatura	Hisopos de ATP leídos en luminómetro; otros parámetros mediante sonda opcional	Sí	18 seg	Temp. Ambiente
Sistema HY-LITE 2	ATP en muestras de superficie, líquidas, industriales y combustible Jet A1	Lectura de los dispositivos de ATP específico de aplicación en el luminómetro	Sí	16 seg	2-8 °C
Valoración colorimétrica FLASH RT	Proteína total, incluyendo alérgenos	Valoración colorimétrica con hisopo para detección proteínas (presencia o ausencia)	No	10 ± 4 min	Temp. Ambiente
Valoración colorimétrica HY-RiSE	NAD / NADH y sus fosfatos	Valoración colorimétrica mediante tiras reactivas y 3 reactivos (humectación, sustrato, enzima)	No	4 – 5 min	Temp. Ambiente o 2–8 °C

Métodos tradicionales

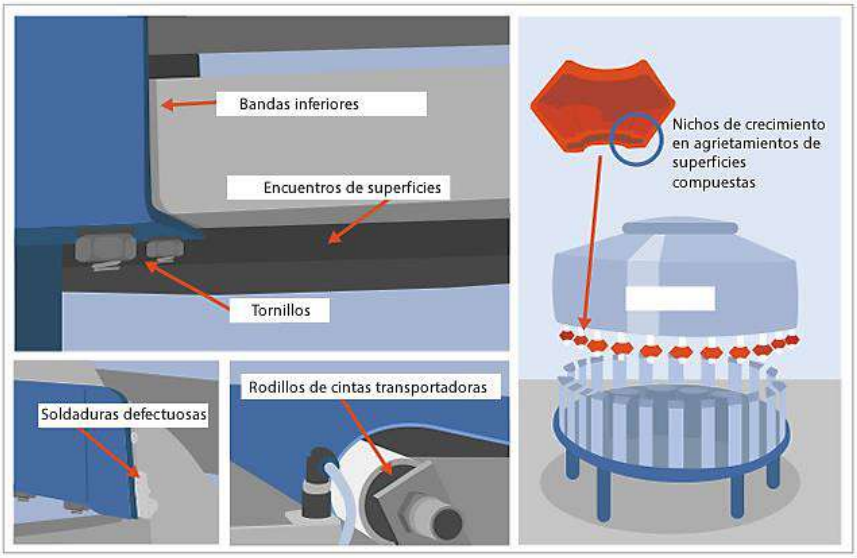
Producto	Objetivos	Cómo medir	¿Se requiere instrumento?	Tiempo de lectura hasta el resultado (TTR)	Conservación del análisis y vida útil
Láminas de inmersión e hisopos	Recuento de microorganismos viables totales, coliformes, levaduras y hongos	Recuento de las colonias microbianas en un único lado después de la incubación	No, excepto una incubadora	24 – 72 h	Temp. Ambiente
Láminas de inmersión Envirocheck®	Recuento total, enterobacterias, *E. coli*, coliformes, levaduras y hongos	Recuento de diferentes colonias microbianas en los lados A y B después de la incubación	No, excepto una incubadora	de 24 h a 7 días	> 15 °C

Ejemplos de muestreo, por contacto directo y mediante hisopos, utilizando 3M™ Placas Petrifilm™ para el recuento de aerobios.



El muestreo durante el proceso productivo en puntos de la zona 1 proporciona datos que se pueden usar para detectar una posible pérdida del control del proceso o condiciones que pueden conducir a la contaminación del producto. También se puede usar para definir los tiempos adecuados de ejecución para las diferentes líneas de procesado, y para apoyar la seguridad de los procesos con tiempos de ejecución prolongados. Además, las pruebas de indicadores en puntos de ambas zonas 1 y 2 representan un método complementario para monitorear las condiciones de los equipos y establecer la frecuencia de mantenimiento preventivo y/o reparaciones.

Ejemplos de nichos potenciales de crecimiento microbiano en los equipos



Para cada punto de muestreo se deben establecer límites aceptables de organismos indicadores. Estos límites se pueden determinar de varias maneras, ya sea mediante niveles de referencia o utilizando el histórico de datos disponibles. Después de la higienización, se considera que el nivel de organismos indicadores en las superficies debe ser bajo. Si los resultados están fuera de estos límites especificados, puede ser necesario implementar medidas correctivas. Las desviaciones significativas deben llevar a una reevaluación del plan de muestreo y de la recolección de muestras. Una vez implementadas las acciones correctivas, debe realizarse un muestreo adicional en ubicaciones estratégicas del área donde se ha detectado el problema, para garantizar la efectividad de las mismas. En otras zonas o líneas donde existen condiciones o riesgos similares, es recomendable aplicar también las acciones correctivas efectivas.

Un programa eficiente de monitoreo ambiental realiza un intento diligente de encontrar el patógeno indicador en cuestión, de modo tal que las correcciones pueden realizarse antes de que el producto se vea afectado y de que se pueda evaluar la eficacia de las intervenciones. Por ejemplo, un programa sólido de monitoreo ambiental puede ayudar a detectar la presencia de patógenos de nicho y a diferenciarlos de las cepas transitorias. Esto sirve para determinar cómo se debe reaccionar ante su detección. Es esencial implementar una cultura que aplique una política permanente de **buscar y destruir** aplicada al monitoreo ambiental.

Se considera una mejor práctica un enfoque de tres etapas: **1) muestreo de rutina (con enfoque en alto riesgo), 2) muestras para investigación y 3) muestreo de seguimiento para confirmar la eficacia de las medidas correctivas.** La frecuencia con la que se recaban los datos puede aumentar o disminuir de acuerdo con un análisis de los datos históricos de las instalaciones, la determinación de patrones de tráfico y el riesgo del producto. El hallazgo de una muestra ambiental positiva es una oportunidad de investigar y ver si algo ha fallado en el programa de control. Tenga en cuenta que algunos resultados positivos son por microbios transitorios y, por ende, no requieren ningún cambio. Por otra parte, algunos resultados positivos exigen tomar medidas para evitar la contaminación del producto.

Una buena investigación se logra combinando observación, inspección y muestreo intensivo. Si la muestra positiva era compuesta, entonces vuelva a tomar muestras de toda el área. Estas muestras se analizan individualmente para identificar y aislar el área con problemas. Además de reanalizar, observe el equipo (montaje y desmontaje), el proceso, el personal y la limpieza y la desinfección para descubrir factores que puedan haber contribuido a la contaminación. También es importante observar el flujo de materiales para determinar si los flujos cruzados constituyen un problema. Partiendo de la investigación, pueden ser necesarios cambios en los procedimientos.

En ocasiones las acciones correctivas pueden focalizarse en un nicho de las instalaciones o en equipo que debe ser retirado, reparado o limpiado. Pueden requerirse también nuevos procedimientos y se deberá capacitar al personal con respecto a estos cambios. Una vez realizadas las correcciones necesarias, se deberá realizar una limpieza y una desinfección profundas. Se confirmará luego su eficacia a través de una toma de muestras intensiva y repetida durante un periodo extenso.

Tome nuevas muestras cubriendo un amplio espectro luego de la limpieza y la desinfección, durante las operaciones, en los cambios de turno y en periodos inactivos durante un tiempo prolongado. Si luego de un evento se obtienen numerosas muestras positivas, la medida correctiva no está funcionando de forma eficaz. Esto puede deberse a la presencia de un refugio o nicho que no fue descubierto o eliminado. Revise toda la instalación, el equipo y los controles operativos para asegurarse de que se han tomado todas las medidas a su alcance. Algunas instalaciones han tenido que detener la producción en ciertas áreas por nichos ambientales que no han podido ser eliminados.

Goteras en el techo, atascos en las rejillas del suelo en áreas de producto expuesto, la construcción o instalación de equipos y la transición entre áreas de construcción y producción pueden aumentar la prevalencia de patógenos ambientales. Deben implementarse procedimientos para proteger las áreas de procesamiento y al producto durante este tipo de eventos. En situaciones relacionadas con goteras o ingreso de agua en entornos secos se recomienda el monitoreo ambiental para detectar la posible presencia de Salmonella. Es útil tomar estas muestras inmediatamente después de limpiar, ya que este representa probablemente el peor de los escenarios. Si no se detecta Salmonella en estas muestras, puede que el ambiente no se vea afectado. Sin embargo, si se detecta el organismo, se deberán tomar acciones inmediatas para desinfectar el área sin utilizar agua de forma extensiva, ya que de lo contrario podría empeorar la situación.

Durante periodos de construcción deben evaluarse los patrones de tráfico para minimizar posibles fuentes de contaminación. El polvo y el tráfico deben controlarse en caso de construcción. Al finalizar las actividades de construcción, el área deberá limpiarse y desinfectarse y se deberán tomar muestras antes de retomar la producción. Para verificar el restablecimiento de los controles, se deben realizar monitoreos ambientales adicionales luego de estos eventos. Se considera una mejor práctica el control y la elaboración de tendencias de monitoreo ambiental. El formato de los informes de resultados tendrá un impacto sobre la información provista. Si usted se toma el trabajo de recabar datos de monitoreos ambientales, asegúrese de maximizar el valor de la información, a fin de poder utilizarla para proteger su producto y sus instalaciones. Los resultados presentados en un formato práctico maximizan el valor de los datos. Por ejemplo, una hoja de cálculo puede ayudar a identificar tendencias de monitoreos de rutina o intensivos. Un mapeo de las instalaciones también puede ser utilizado para mostrar la ubicación de los positivos y determinar si se ubican en el mismo lugar, lo que podría indicar un nicho ambiental. Los resultados colocados en un mapa pueden utilizarse para demostrar la efectividad de los controles preventivos para patógenos ambientales.

Reúna la información de todas las fuentes de datos que tenga disponibles y luego reconstruya lo que estaba ocurriendo cuando se tomaron las muestras. Quizás esto conlleve analizar cronogramas de producción, cronogramas de desinfección, registros de visitas y otras fuentes de información, para determinar si ocurrió algo fuera de lo común. Con base en la información recabada, identifique una fuente potencial de contaminación, luego confirme sus sospechas a través de observación adicional o recolección de datos.

Es importante documentar la conclusión de la investigación, la causa principal y tomar las medidas correctivas para solucionar el problema. Su objetivo final debe ser identificar una causa que tenga sentido, de acuerdo con la información disponible, luego tomar medidas y demostrar que las medidas fueron eficaces. Los resultados negativos son buenos hasta cierto punto, ya que pueden crear una falsa sensación de seguridad. La mayoría de las instalaciones detectan patógenos ambientales de vez en cuando, que suelen ser cepas transitorias. Si los resultados de los monitoreos ambientales son siempre negativos, pregúntese por qué lo son. Recuerde, los análisis no son un "control"; los resultados positivos también pueden ser buenos ya que uno puede tomar medidas antes de que se detecte el patógeno en un producto.

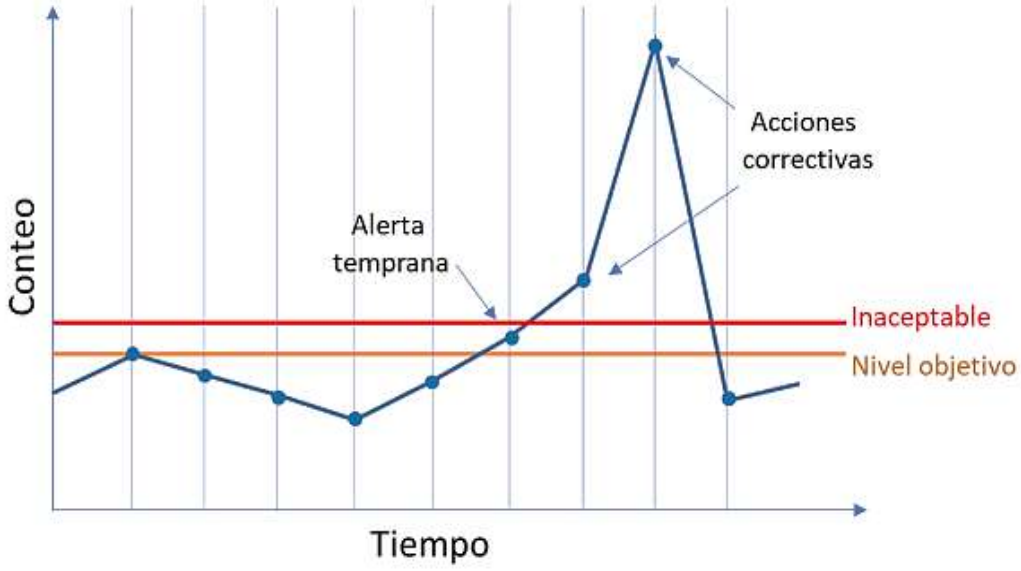
Los programas de monitoreo ambiental deben analizarse y actualizarse al menos una vez al año. Si se cuenta con un programa sólido, las modificaciones se realizan cuando así se requiera, por ejemplo, cuando resultan de las medidas correctivas y cuando se producen cambios en los ingredientes, los procesos o el equipo. Si nunca se obtienen resultados positivos y esto no es lo esperable, ello puede significar que el programa no está siendo gestionado con una actitud proactiva de buscar y destruir. Cualquier auditor experimentado se mostrará escéptico ante un programa de monitoreo ambiental que nunca muestra resultados positivos en el largo plazo.

Preguntas que deben formularse en el establecimiento de estrategias de vigilancia del medio ambiente

Pregunta	Menor riesgo	Mayor riesgo
¿El alimento recibe un tratamiento listericida para reducir *L. monocytogenes*?	Sí	No
Es el alimento formulado para prevenir el crecimiento de *L. monocytogenes* o ser letal para *L. monocytogenes* (por ejemplo, a través de características intrínsecas como el pH o la actividad del agua)?	Sí	No
¿Cuánta manipulación recibe el alimento después de un paso de reducción de patógenos y antes del envasado?	Mínimo	Extenso
¿Recibe el alimento una lista de medidas de control en el paquete?	Sí	No
¿Cuál es la vida útil del producto durante el almacenamiento refrigerado?	Corto	Largo
¿El alimento RTE envasado apoya el crecimiento de *L. monocytogenes* en condiciones normales de almacenamiento?	No	Sí

Al hablar de una **superficie viva** nos referimos a las áreas del cuerpo humano que entran en contacto con el equipo, utensilios y alimentos durante su preparación y consumo. En el caso de las **superficies inertes**; son todas aquellas áreas o utensilios no vivos que están involucrados en el proceso de producción y/o almacenamiento de los productos.

La higiene de las superficies, equipos y utensilios, es fundamental, ya que de ellos dependen parte de las buenas prácticas de manufactura y si se considera que un porcentaje de los alimentos producidos poseen algún tipo de contaminación, es indispensable monitorear y analizar estos factores para que la contaminación no se dispare a escalas y donde pudieran existir microorganismos capaces de resistir los procedimientos comunes de limpieza. Los microorganismos se encuentran presentes en nuestra piel. Cuando el tema a tratar es la microbiología de alimentos, es importante determinar el grado de contaminación de los manipuladores, que pueden influir en el alimento y pueden causar infecciones alimentarias por lo que se tener en cuenta en la higiene de los manipuladores. Los microorganismos se encuentran presentes en la superficie de los objetos de superficies inertes, mesas de trabajo, fajas transportadoras, tolvas, máquinas, tuberías que tiene contacto con alimentos se debe monitorear los microorganismos presentes y determinar el grado de contaminación que van a influir en el número y tipo de microorganismos presentes en alimento. Para llevar a cabo una correcta manipulación de los alimentos es necesario mantener una limpieza adecuada tanto en las superficies de trabajo como en los utensilios que hay que emplear. En la manipulación, el envasado y el almacenaje de los alimentos, estos microorganismos deben mantenerse en todo momento en niveles que aseguren la calidad microbiológica del alimento.



Métodos no microbiológicos: Bioluminiscencia, misceláneas y alérgenos

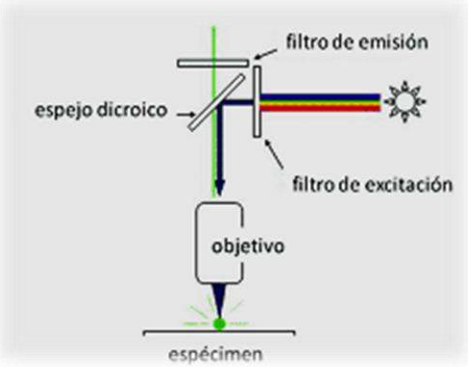
Existe un creciente interés en el ámbito internacional en la adaptación y en la investigación sobre métodos rápidos en el campo de la microbiología de los alimentos. La necesidad de reducir tiempos de detección de los microorganismos ha llevado al desarrollo de nuevas metodologías que permiten con la misma fiabilidad, reproducibilidad y repetitividad que los ensayos clásicos, la certificación de la calidad de los productos alimentarios. Estas nuevas metodologías fundamentan su aplicación en la detección de microorganismos de manera indirecta o directa.

Entre los sistemas indirectos los más utilizados para el control de superficies son las **técnicas de bioluminiscencia, de inmunoensayo y de impedancia eléctrica**. No obstante, el uso de métodos indirectos puede inducir a resultados erróneos. Existen una serie de atributos que deben tenerse en cuenta al elegir un sistema de análisis microbiológico rápido y/o automatizado:

1. Criterios estrictamente microbiológicos: los métodos rápidos deben ser exactos para la finalidad que se pretende, tan sensible como sea posible, y con una mínima producción de resultados falsos positivos y/o falsos negativos. También si se va a analizar una flora determinada deberán tener una alta especificidad.
2. Velocidad: deben ser más rápidos que los métodos tradicionales. Esta reducción en el tiempo para la obtención de resultados puede deberse a uno o varios de los siguientes factores: simplificación de los existentes, mayor rapidez intrínseca de los nuevos métodos, mecanización, automatización y capacidad de los instrumentos empleados. De hecho, algunos análisis son casi instantáneos, por ejemplo, las medidas de ATP en la verificación del grado de higiene, o los análisis enzimáticos rápidos como la prueba de la catalasa. En el momento actual se considera una prueba como "rápida" si el resultado es obtenido en 4 horas desde el momento de inicio de la misma. Por otra parte, hay instrumentos que pueden procesar decenas o centenas de muestras al mismo tiempo, como es el caso del **Bactometer™**, lo cual será especialmente importante para los laboratorios que tengan que examinar grandes cantidades de las mismas.
3. Costo: en este factor se incluye el costo inicial de compra del equipo, y el posterior costo por prueba (reactivos y materiales necesarios, personal etc).
4. Aceptabilidad: para un método nuevo tenga éxito, debe ser aceptado por la comunidad científica (estudios colaborativos, verificación por organismos de prestigio como: AFNOR, ISO, AOAC, ICMSF, FDA, entre otros).
5. Simplicidad: además, los métodos deben ser fáciles de operar y manipular y a ser posible automatizados.
6. Entrenamiento: a medida que los instrumentos se vuelven más simples y automatizados, el entrenamiento se vuelve más fácil y lleva menos tiempo.
7. Reactivos y suministros: los reactivos y materiales específicos que se necesitan para realizar la prueba han de estar fácilmente disponibles. Además, los reactivos han de ser estables y fáciles de preparar.
8. Reputación de la compañía: las compañías con larga historia de buena reputación ganarán más fácilmente la confianza del consumidor. Las compañías nuevas o menos conocidas deben apoyarse en el buen funcionamiento de sus productos.
9. Servicio técnico: una compañía que pueda garantizar un servicio técnico rápido tendrá preferencia en este campo competitivo.
10. Requerimiento de espacio: en general se prefiere que los instrumentos sean compactos y pequeños.

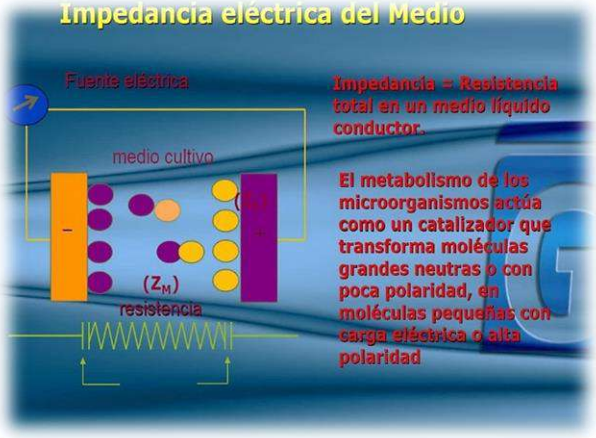
Finalmente, podemos afirmar, que los patógenos oportunistas como son S. aureus, E. cloacae y P. aeruginosa pueden desarrollarse y multiplicarse en las superficies siempre que estén húmedas, lo que suponen un peligro potencial de contaminación directa hacia los productos alimenticios, sobre todo si se tiene en consideración que la presencia de microorganismos adheridos en las superficies se transfiere directamente por contacto del alimento con la superficie contaminada.

Actualmente hay un gran número de publicaciones que constatan la importancia que tiene la presencia de microorganismos patógenos, ambientales y alterantes en las superficies de procesado y su capacidad de colonizar y desarrollar biofilms cuando las condiciones son favorables. Por ejemplo, S. aureus es capaz de sobrevivir y detectarse en las superficies secas aún 96 hs luego de dicha desecación. Sin embargo, Salmonella enteritidis y Enterobacter spp (perteneciente a la familia Enterobacteriaceae) aparecen como negativas luego de 24 hs de comenzada la desecación de la zona. Estudios recientes, basados en el estrés bacteriano, han demostrado que en las bacterias adheridas a una superficie sometida a un estrés externo como por ejemplo un choque osmótico, térmico o la acción de un antimicrobiano, se produce una pérdida de la capacidad de recuperación del microorganismo en placa. No hay que olvidar que el recuento de unidades formadoras de colonias solamente incluye aquellas bacterias capaces de multiplicarse, crecer y formar una colonia en un medio de cultivo en placa.



La **microscopia de Epifluorescencia directa** combinada con la aplicación de tinciones de viabilidad, se ha mostrado como una técnica más rápida, fiable y precisa que el método tradicional de recuento en placa para la evaluación del estado vital de las bacterias tras un proceso de desecación y/o higienización, así como para la posible detección de biofilms adheridos a las superficies. Se basa en el filtrado de la muestra a través de una membrana que retiene mohos, bacterias y levaduras y en teñir estos microorganismos con el colorante fluorescente para su conteo mediante microscopio de epifluorescencia. La fluorescencia es una reacción de luminiscencia en la que la energía de una luz incidente es absorbida por los átomos de moléculas o por iones de sustancias fluorescentes capaces de emitir una luz de longitud de onda superior a las que la ha excitado previamente.

Por su lado, la **impedancia** podría ser utilizada como un método rápido, simple y alternativo al método tradicional de recuento en placa para verificar la calidad higiénica de las superficies de trabajo tras la higienización, que puede ser optimizado si se analiza directamente el hisopo.



Además, la rapidez de resultados permitiría adoptar medidas correctoras lo antes posible en el caso que se detectasen superficies en condiciones microbiológicas insatisfactorias que pudieran suponer un riesgo para salud o la recontaminacion del producto.

La **técnica de bioluminiscencia** en condiciones experimentales es un método válido, rápido y preciso para evaluar la contaminación microbiana en superficies. Sin embargo, cuando es aplicado en la industria alimentaria muestra una gran variabilidad en relación al recuento microbiano debido a la presencia de materia orgánica, así como de otros inhibidores. La determinación de ATP podría utilizarse como un método rápido de elección para realizar la vigilancia de la limpieza y desinfección en la industria de congelados estudiada, aunque debería complementarse con análisis microbiológicos especialmente en la zona de elaborados. En la industria alimentaria promedio, la zona más contaminada a nivel microbiológico es normalmente, la de elaboración, debido al tipo de material de las superficies constituido mayoritariamente por polietileno articulado y a las condiciones ambientales de elevada humedad.

La zona con un alto valor medio de ATP por bioluminiscencia es por lo general, la cocina asociada a la suciedad, a la presencia de levaduras, y a la posible presencia de VBNC (viables, pero no cultivables), debido a las condiciones ambientales de menor humedad relativa. En la industria de congelados la microbiota observada y persistente tras el proceso de limpieza y desinfección es por lo general: *Pseudomonas* de forma generalizada, *Flavobacterium, Moraxella y Bacillus* en la zona de carne, *Enterobacter y Serratia* en la zona de elaborados y levaduras en la zona de cocina. Debido a las crisis alimentarias acaecidas durante finales del siglo XX y comienzos del actual, se produjo un incremento de la concienciación de los consumidores respecto a la seguridad de los alimentos. A su vez, las autoridades, tanto nacionales como mundiales, reflejaron esta preocupación en unas nuevas normativas alimentarias. Al mismo tiempo, las cadenas de distribución, se hicieron eco de esta preocupación y, como clientes de los fabricantes, y proveedores del consumidor final, han establecido sistemas de control de sus proveedores basados en los principios que rigen esas normativas. Las empresas del sector alimentario, a partir de 2020 y a caballo de la pandemia de COVID19, comenzaron a aplicar los principios del sistema de análisis de riesgos y control de los puntos críticos (APPCC) establecidos en el Codex Alimentarius en su última actualización.

Como parte de los prerrequisitos, previos a la implantación del sistema **APPCC o HACCP**, juega un papel de gran importancia el mantenimiento en correctas condiciones higiénicas de todas las zonas de elaboración y almacenamiento de alimentos. Por ello, adquieren especial relevancia los protocolos de Limpieza y Desinfección de las instalaciones, y con ellos la verificación de que estos se están cumpliendo conforme a lo establecido. Esta verificación de la idoneidad de los procesos de L+D se puede realizar de distintos modos. Por medio de análisis de superficies mediante placas de contacto, con medios selectivos, puede conocerse la bondad del proceso de limpieza y desinfección. Estos sistemas de verificación basados en la microbiología son de gran utilidad, y se han establecido especificaciones para delimitar los niveles microbiológicos correctos.

Para cumplir con los límites microbiológicos establecidos en estas especificaciones es importante que los procesos que forman parte de la higienización: Limpieza y Desinfección, se realicen correctamente. Las prácticas inadecuadas en alguno de ellos darán lugar a niveles microbiológicos elevados en la instalación, y la posibilidad de que se produzcan contaminaciones cruzadas a los productos elaborados.

Ya se ha señalado anteriormente cómo podemos conocer la presencia de microorganismos en superficies mediante las placas de contacto, es una técnica que consigue resultados repetitivos y fiables, y que por tanto nos indica muy certeramente la bondad de los procesos. Sin embargo, para que los resultados microbiológicos sean correctos, además de realizar una correcta desinfección de las superficies, es importante que estas se hayan limpiado a fondo, y que no queden restos orgánicos que puedan interferir la acción biocida de los desinfectantes. La verificación de la fase de limpieza es un aspecto que usualmente se ha realizado mediante inspecciones visuales de los elementos de la instalación, estableciendo una escala valorativa, en función de los restos orgánicos que puedan quedar. Sin embargo, esta valoración no está exenta de subjetividad, y en muchos casos los resultados pueden variar en función de la persona que realice la inspección, y en todo caso siempre estarán sujetos a discusión. Para evitar este problema, y objetivar las inspecciones de la limpieza, se puede utilizar el método de la bioluminiscencia.

Con esta técnica se muestrea una parte de la instalación con un hisopo y se determina por bioluminiscencia su contenido en **ATP (Adenosín trifosfato)**. El ATP es el compuesto que almacena la energía en todas las células vivas. Está presente en los alimentos tanto como ATP de origen orgánico, como parte de las carnes, pescado, vegetales, etc., o como ATP de procedencia microbiana. El complejo enzimático luciferin-luciferasa convierte la energía química del ATP (microbiano y no microbiano) en luz a través de una reacción de óxido-reducción. La reacción bioluminiscente catalizada por la luciferasa utiliza la energía química contenida en la molécula de ATP para producir la descarboxilación oxidativa de la luciferina a oxiluciferina, dando como resultado la producción de luz. La cantidad de luz emitida es proporcional a los niveles de microorganismos y/o materia orgánica presente en la muestra que se pretende evaluar. La luz emitida es posteriormente cuantificada usando un equipo denominado luminómetro, que expresa el resultado medido en unidades relativas de luz (URL). La cantidad de ATP recuperado en el hisopo depende de la contaminación microbiana y de la presencia de residuos orgánicos. Estos valores varían según el tipo de materia (superficie), el tipo de proceso, el tipo de células predominantes, el grado de procesamiento de la materia prima, etc. Por lo tanto, resulta importante establecer los umbrales de aceptación de acuerdo con cada caso en particular. El ATP es un intermediario del metabolismo energético de todos los organismos vivos. La cuantificación se hace a partir de una técnica enzimática basada en la medición de la bioluminiscencia emitida a partir de la reacción:

La medida del ATP permite, pues, indicar en tiempo real si la limpieza de las superficies se ha realizado correctamente, y además pueden corregirse situaciones incorrectas antes de la siguiente jornada de trabajo. Sin embargo, como se ha indicado, para poder trabajar con esta técnica, es importante, al igual que se ha realizado con las técnicas de análisis microbiológico de superficies, establecer criterios objetivos (límites críticos o especificaciones) que indiquen qué niveles pueden considerarse correctos. La torunda se frota contra la superficie a muestrear, aplicando presión. Se va girando la torunda para utilizar toda la superficie mientras se toma la muestra. Se aplica a una superficie de 10 x 10 cm., en horizontal, de un lado a otro, y después en vertical.

Previamente, para cada planta donde se efectuaron los ensayos, se había confeccionado un protocolo de L+D. La toma de muestras e inoculaciones se realizaron durante y después de finalizada la jornada habitual de trabajo, y tras la realización de las prácticas de limpieza y desinfección. El rendimiento de la reacción es aproximadamente del 100%. La luz emitida (fotones) se puede medir a una longitud de onda de 562 nm y es directamente proporcional al número de moléculas de ATP transformadas. El aparato que mide la emisión de luz, el luminómetro, expresa los resultados en Unidades Relativas de Luz (URL). Asumiendo que el ATP desaparece rápidamente después de la muerte celular, las URL se relacionan directamente con la suciedad biológica, entendida como la constituida tanto por restos orgánicos (de origen vegetal o animal) como por microorganismos.

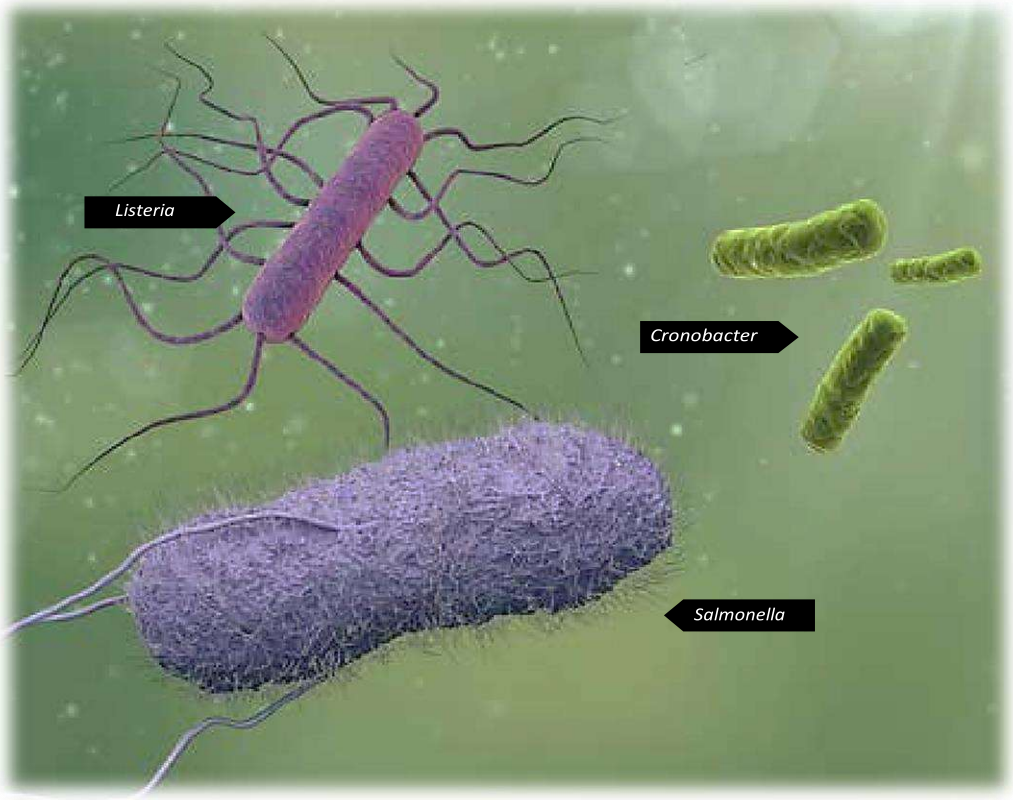
Se determinó la eficacia de las prácticas de limpieza y desinfección descritas mediante análisis microbiológicos previos, interpretados de acuerdo con la bibliografía y las especificaciones en vigencia. Aunque ya se ha indicado que, en las medidas de bioluminiscencia se incluyen tanto el ATP microbiano, como el perteneciente a restos orgánicos, y por tanto un valor elevado puede indicar presencia de suciedad orgánica, pero es posible que no haya elevada presencia de microorganismos, debido a la acción de los productos biocidas aplicados; se considera que, si se alcanzan niveles microbiológicos correctos, según las especificaciones, es porque el nivel de limpieza es correcto.

La evaluación del nivel de limpieza de superficies, mediante la aplicación de la técnica de bioluminiscencia, mediante determinación de ATP, y la interpretación de resultados siguiendo los criterios aquí deducidos, demuestra tener un alto grado de fiabilidad, ya que se obtienen resultados muy repetitivos. La prueba del ATP es un método sensible y rápido para medir el crecimiento de microorganismos a través de la detección del trifosfato de adenosina (ATP), una molécula transportadora de energía que se encuentra en las células vivas. El llamado sistema **MVP ICON®**, es un sistema de análisis del ATP y una plataforma informática que combinan el análisis de peligros y críticos puntos de control (HACCP) y el control de la higiene con poderosas capacidades de gestión del programa. Para aplicaciones industriales especializadas como pruebas de combustible, fluidos de procesos industriales y evaluación del grado de contaminación microbiológica para determinar la calidad del agua, se utiliza el sistema de control **HY-LITE®2 ATP con el software TREND2.**

Análisis de proteínas: Las superficies de contacto con el alimento pueden parecer limpias pero seguir teniendo trazas de restos de proteínas, que son difíciles de eliminar. Indetectables, pueden aportar una fuente nutritiva para el crecimiento de bacterias nocivas. Y, dado que la mayoría de los alérgenos alimentarios son proteínas, el análisis regular de las proteínas puede constituir un método efectivo para verificar los métodos de limpieza y evitar la contaminación cruzada de los productos que carecen de alérgenos. La prueba de proteínas totales **FLASH®**, brinda una lectura visual con resultados en 10 minutos, lo que permite la adopción inmediata de medidas correctoras. No es requerido ningún instrumento y la prueba puede ser realizada por todo el personal sin necesidad de una extensa formación.

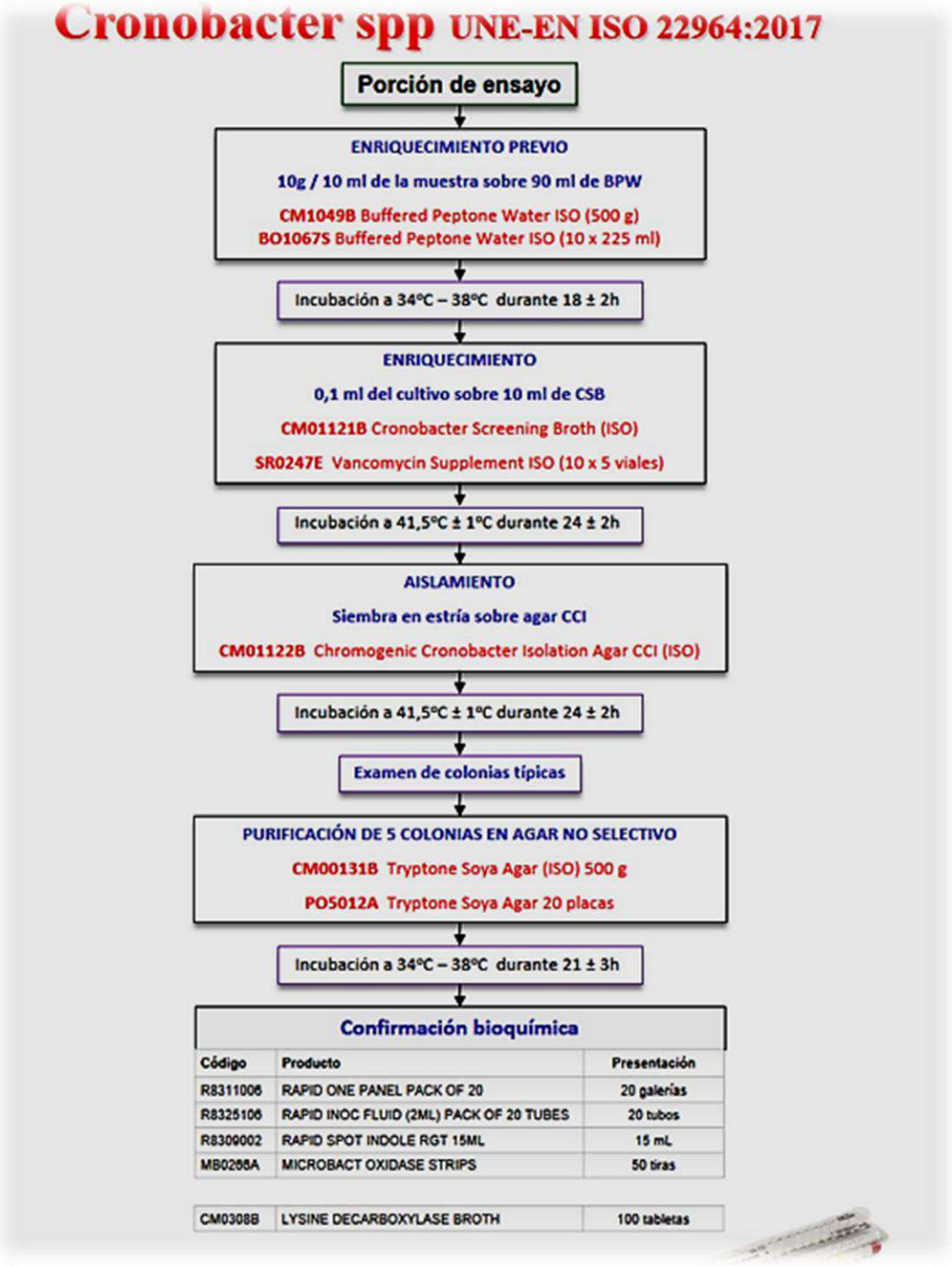
Análisis del NAD y NADH: Los dinucleótidos de nicotinamida y adenina (NAD y NADH) son compuestos que se encuentran en todas las células vivas, incluidos los microorganismos. Los kits de detección **HY-RiSE®**, miden con rapidez y fiabilidad el NAD y sus fosfatos, e indican la presencia de microorganismos mediante la aparición de color en la tira reactiva.

Según últimos informes de la FDA, las mejoras en el saneamiento, la reparación de los equipos y los cambios en los procesos pueden permitir la aplicación de una nueva línea de referencia y de límites aceptables más bajos.

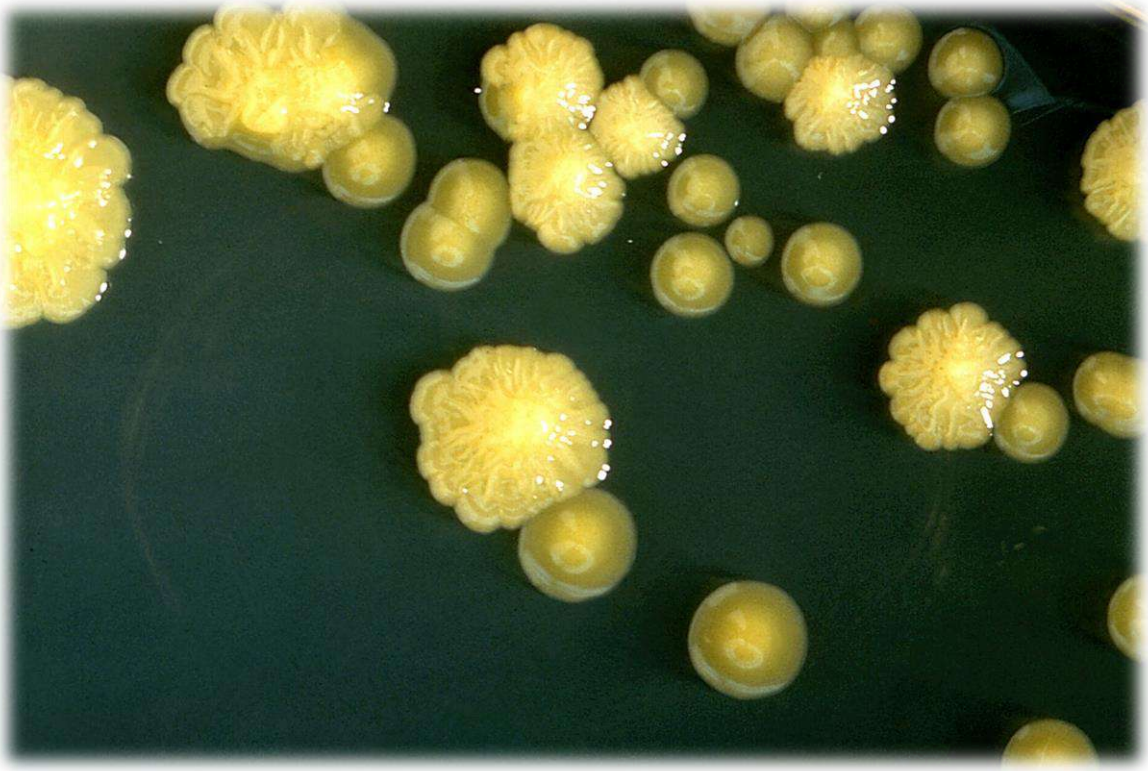


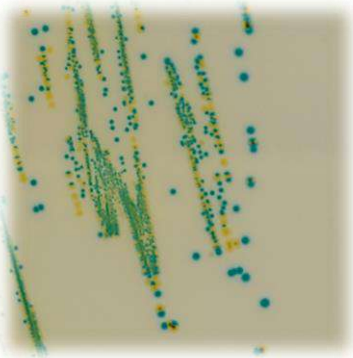
Prueba cuantitativa de indicadores microbiológicos	Objetivo / límites aceptables	Tratamiento postcalentamiento tomado antes del desinfectante (ufc/250 cm^2)	Tratamiento postcalentamiento - preoperativo tomado después del desinfectante (ufc/250 cm^2)
Recuento de aerobios en placa	Objetivo	<100	<10
	Aceptable	<500	<100
Coliformes	Objetivo	<10	<10
	Aceptable	<100	<50
Total de *Enterobacteriaceae*	Objetivo	<10	<10
	Aceptable	<100	<50

Por último y para finalizar este tema, abordaremos la investigación de un patógeno que ha reaparecido últimamente y con un alto grado de peligrosidad. El género Cronobacter (antes Enterobacter sakazakii) se ha modificado en las últimas décadas debido a la continua investigación genotípica y fenotípica de diversas cepas que han ido apareciendo con el tiempo. Se ha demostrado que las fuentes de Cronobacter son principalmente matrices vegetales (maíz, soja, trigo, arroz, hierbas, especias), así como leche en polvo y preparados en polvo para lactantes. Las especies de Cronobacter son patógenos oportunistas y se ha descubierto que son la causa de enfermedades que ponen en peligro la vida de los recién nacidos, los bebés y personas mayores con el sistema inmunológico debilitado.



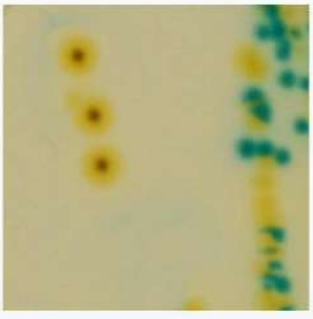
La contaminación de los preparados en polvo para lactantes ha sido la principal causa de infecciones en recién nacidos y lactantes, lo que ha dado lugar a muchos brotes en todo el mundo y al retiro del mercado de preparados en polvo para lactantes. Además del producto terminado, se ha aislado Cronobacter en los entornos de las plantas de leche en polvo y de preparados en polvo para lactantes (incluidos los tambores de secado, las torres de secado y las bahías de los camiones cisterna) y se ha demostrado que persiste en esos ambientes durante largos períodos de tiempo debido a su resistencia a la desecación y a su capacidad para sobrevivir al secado por aspersión.





El monitoreo de Cronobacter en los entornos de las plantas de leche en polvo y de preparados en polvo para lactantes es fundamental para prevenir la contaminación del producto terminado. Debido a los cambios en la clasificación taxonómica, es especialmente importante seleccionar un método que detecte de manera fiable todas las especies de Cronobacter.

CHROMagar Cronobacter, es un medio cromogénico para la detección de *Cronobacter spp*. en alimentos, piensos y muestras ambientales según la norma ISO 22964 y crece en colonias de verde a azul mientras que la mayoría de las otras bacterias se inhiben o crecen en colonias incoloras, después de la incubación a 41,5 °C durante 24 h.



Otras Gram (-)
incoloras, verde claro, negro, amarillas

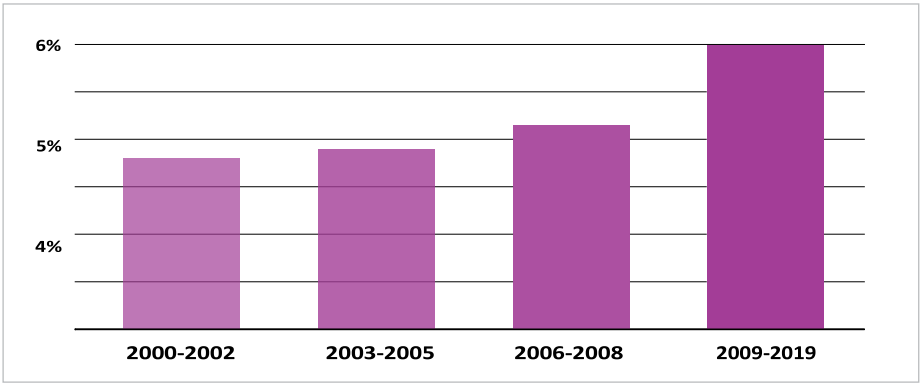
ALERGENOS

Los alérgenos alimentarios se han convertido en una preocupación cada vez mayor para los fabricantes de alimentos y bebidas. En 2022, la FDA estimó que aproximadamente el 2% de los adultos y alrededor del 5% de los lactantes y niños pequeños de los Estados Unidos sufren cada año de alergias alimentarias Además, en dicho año, alrededor de 30.000 personas requirieron tratamiento en salas de emergencias y 150 personas murieron debido a reacciones alérgicas a los alimentos.

En los últimos años, el número de personas diagnosticadas con alergias alimentarias ha aumentado de manera notable, así como el número de visitas al hospital. Esto repercute directamente en los gastos de salud pública y en la pérdida de productividad. Al mismo tiempo, los alérgenos que no se declaran en las etiquetas de los alimentos y las bebidas han figurado sistemáticamente entre las principales causas de retiro de productos alimenticios, lo que tiene un impacto mayúsculo en los fabricantes de alimentos. Si bien lo ideal sería contar con plantas dedicadas a la producción de alimentos con alérgenos y otras para alimentos sin alérgenos, la realidad es que alimentos que no deberían contener determinados alérgenos pueden fabricarse en las mismas plantas y, a menudo, con el mismo equipo que los alimentos que contienen alérgenos.

Por consiguiente, un programa sólido de monitoreo ambiental tiene que contemplar medidas para la detección de alérgenos en los equipos de fabricación después de la limpieza y antes de la elaboración del siguiente producto Además, se debe evaluar la presencia de alérgenos en el ambiente para evitar el contacto cruzado de los alimentos con los mismos.

Porcentaje de niños estadounidenses con alergias alimentarias a lo largo del tiempo



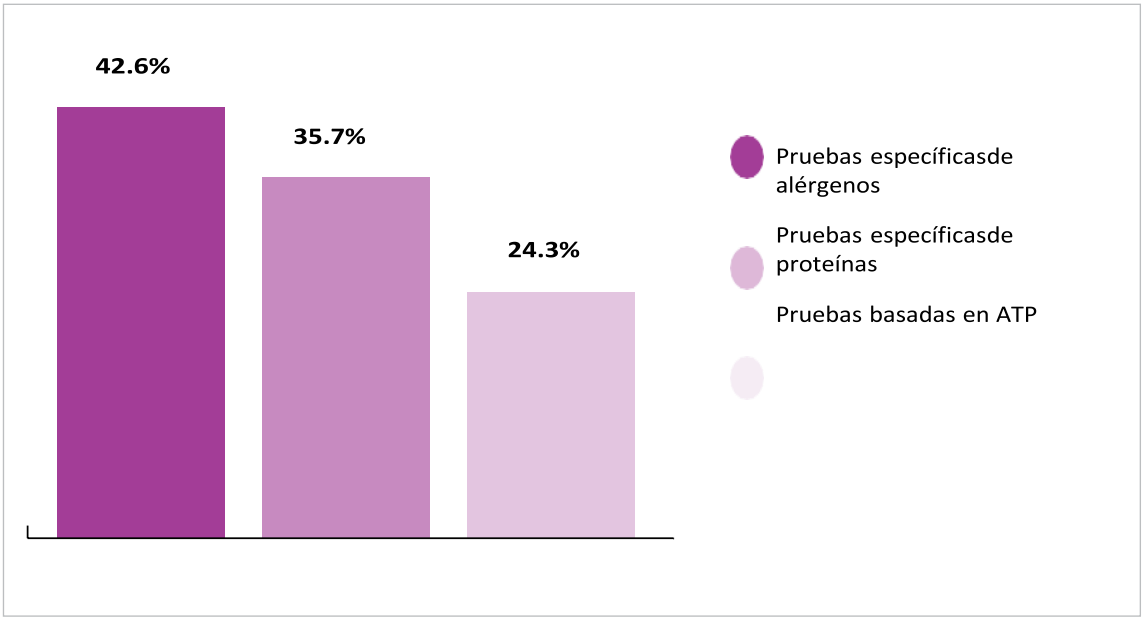
Estados Unidos (los"8 Grandes")	Canadá (10 Alérgenos)	Australia/Nueva Zelandia (12 Alérgenos)	UE (14 Alérgenos)
Leche	Leche	Leche	Leche
Huevo	Huevo	Huevo	Huevo
Maní	Maní	Maní	Maní
Poroto o frijol de soya	Soya	Soya	Soya
Trigo	Trigo	Gluten (incluyendo trigo,cebada, centeno, etc.)	Gluten (incluyendo trigo, cebada, centeno, etc.)
Frutos secos	Frutos secos	Frutos secos	Frutos secos
Pescado	Mariscos	Mariscos (pescado)	Pescado
Mariscos crustáceos		Mariscos	Crustáceos
			Moluscos
	Mostaza	Mostaza	Mostaza
	Sésamo	Sésamo	Sésamo
	Sulfito*	Sulfito*	Sulfito*
		Lupino	Lupino
			Apio

La Ley de Modernización de la Inocuidad Alimentaria (FSMA, Food Safety Modernization Act), exige a los fabricantes de los Estados Unidos o que exportan a los Estados Unidos que incluyan controles de alérgenos en su plan de inocuidad alimentaria. De igual modo, los diversos planes que se utilizan normalmente para el cumplimiento de la Iniciativa Mundial de Inocuidad Alimentaria (GFSI, Global Food Safety Initiative) también exigen la identificación y el monitoreo de los controles de alérgenos. En 2020, el Codex Alimentarius lo incluyó entre sus modificaciones.

Aunque no se exige de manera explícita en los planes de Análisis de peligros y puntos de control críticos (HACCP, Hazard Analysis and Critical Control Points), existe la expectativa implícita de que los alérgenos se identifiquen como peligros y de que se establezcan controles críticos para evitar la contaminación inadvertida de productos con alérgenos. En las plantas y líneas de producción que fabrican tanto alimentos que contienen alérgenos como alimentos que no deben contenerlos, es fundamental tomar las medidas adecuadas para garantizar que no haya contacto cruzado entre los alimentos. En algunos casos, esto se puede manejar mediante la programación de las operaciones de fabricación para limitar el riesgo. Sin embargo, esto no elimina el posible riesgo de contaminación cruzada por sí solo, incluso con un programa de limpieza sólido.

Debido a esto, se requiere el monitoreo ambiental tanto para la validación inicial del procedimiento de limpieza como para la verificación continua de que la limpieza se haya ejecutado de acuerdo con procedimientos por escrito. Los fabricantes de alimentos utilizan diversos enfoques y pruebas como parte de un programa de alérgenos para la inocuidad alimentaria. Hoy en día, el 30% de los fabricantes de alimentos y bebidas informan del uso de múltiples pruebas de alérgenos. Tradicionalmente, se han utilizado dos enfoques generales de pruebas de alérgenos para verificar la limpieza: pruebas de alérgenos específicos y no específicos.

Pruebas de alérgenos de los fabricantes de alimentos según el método



Las pruebas de alérgenos específicos utilizan un enfoque de reconocimiento objetivo para detectar las proteínas dentro del alimento alergénico. Estas pruebas pueden utilizarse para identificar y/o cuantificar la cantidad de alimento alergénico que puede estar presente en una muestra. Por ejemplo, una planta que produce helado de mantequilla de maní y helado de vainilla debe asegurarse de que el helado de mantequilla de maní se elimine por completo del equipo de fabricación. Podrían utilizar una prueba basada en anticuerpos, como el dispositivo de flujo lateral (LFD, Lateral Flow Device) o el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para detectar y/o cuantificar las proteínas del maní utilizando anticuerpos contra la proteína purificada.

Además, el procesamiento puede afectar al reconocimiento de las proteínas objetivo por los anticuerpos de la prueba. Por ejemplo, el tratamiento térmico de los alimentos (ya sea hervirlos, hornearlos, tostarlos, etc.) o incluso las temperaturas utilizadas durante la limpieza (por ejemplo, limpieza con vapor) pueden alterar la sensibilidad de la prueba a los residuos de alérgenos en el ambiente. Es importante asegurarse de que el ensayo seleccionado para el monitoreo ambiental sea capaz de detectar tanto los alérgenos no procesados térmicamente como los procesados térmicamente. Los usuarios deben tener especial cuidado con los alimentos que pasan por la fermentación (por ejemplo, la salsa de soja, la cerveza de trigo) o la digestión enzimática/química (por ejemplo, las proteínas hidrolizadas que se utilizan en algunos preparados para lactantes). Los procesos alimentarios en los que las proteínas pueden estar muy fragmentadas en pequeños péptidos podrían hacer que los alimentos alergénicos sean indetectables para las pruebas tradicionales de ELISA o de flujo lateral.

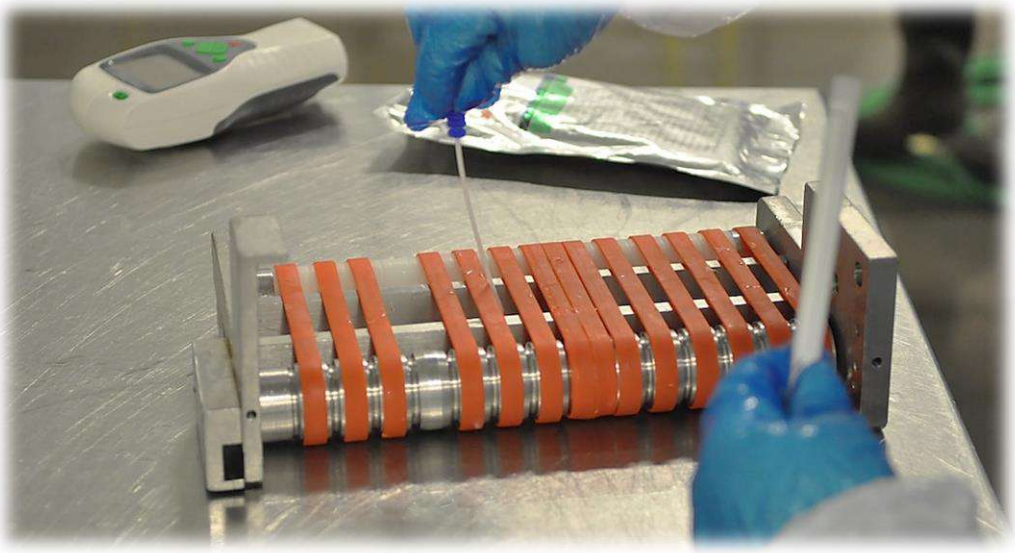
Por esta razón, es importante que el método seleccionado utilizado para la verificación de la limpieza sea adecuado para el propósito y, por lo tanto, capaz de detectar los alérgenos de interés en el proceso de los usuarios.

El uso de una prueba de alérgenos basada en la aplicación de anticuerpos específicos tiene la ventaja de su alta especificidad. Si una prueba basada en anticuerpos da un resultado positivo con una prueba de gluten, por ejemplo, hay un alto grado de certeza de que la muestra de agua de superficie o de enjuague está contaminada con gluten. Debido a esta selectividad, la iniciativa GFSI requiere pruebas de alérgenos específicos para la validación del proceso. Si se diseña un proceso de limpieza para eliminar la leche del equipo de procesamiento antes de producir la leche de soja, entonces se necesita un ensayo ELISA o un dispositivo LFD específico para la leche a fin de validar la capacidad del proceso para eliminar la leche residual. Por lo general, esto se realizar mediante pruebas antes y después de la limpieza para mostrar, específicamente, que los residuos de leche se han eliminado efectivamente.

Los métodos LFD y ELISA pueden ayudar a definir un sistema HACCP mediante la inspección del equipo de procesamiento y la búsqueda de los "puntos conflictivos". Esto puede revelar qué áreas (por ejemplo, las válvulas e interfaces de los equipos) necesitan un monitoreo futuro o deben optimizar los ciclos de limpieza en sitio (CIP). Una vez finalizada la validación, las pruebas de rutina posteriores a la limpieza permiten a los usuarios verificar que los procedimientos de limpieza validados se están llevando a cabo con eficacia. Por ejemplo, los resultados que determinen que los residuos alergénicos se encuentran en niveles bajos o indetectables después de la limpieza de rutina durante un cambio de línea servirían como una verificación útil. Si bien la mayoría de las empresas conocen el alérgeno específico que deben monitorear, la especificidad de los métodos de ELISA y LFD también representa un inconveniente cuando se trata de alimentos que contienen múltiples alérgenos.

Por ejemplo, una línea de producción de aderezo para ensaladas que contenga huevo, leche, gluten y soja programada para producir a continuación una vinagreta sin ninguno de estos alérgenos requeriría la verificación de que los alérgenos se han eliminado mediante el uso de pruebas específicas para el huevo, la leche, el gluten y la soja. Es posible que se pueda elegir un solo alérgeno objetivo que sea representativo de los cuatro alérgenos y que pueda indicar que no quedan residuos del aderezo para ensalada anterior. En este caso, se podría elegir la concentración más alta de la matriz, por ejemplo, la leche, o el alérgeno más difícil de eliminar, por ejemplo, el huevo. En estas situaciones, una prueba de alérgenos no específicos puede ser una alternativa a los métodos de ELISA y LFD. Las pruebas de alérgenos no específicos incluyen el ATP y los hisopos para detección de proteínas en superficies. Aunque el ATP no mide directamente los alérgenos, tiene sentido que si una superficie se limpia suficientemente bien como para eliminar el ATP a un nivel bajo, entonces la limpieza ha sido adecuada para eliminar los alérgenos. Dicho esto, se sabe que la solubilidad del ATP, una pequeña molécula de carga negativa, puede ser muy diferente de las proteínas alergénicas de los alimentos que pueden ser horneados en la superficie. Además, algunas fuentes de alimentos alergénicos como la clara de huevo tienen niveles bajos de ATP, lo que hace que el ATP sea un mal sustituto para la eliminación de estas proteínas alergénicas. Por esta razón, los hisopos para detección de proteínas altamente sensibles ofrecen una evaluación directa del éxito de la eliminación de las proteínas alergénicas de una superficie durante la limpieza. La razón es que si las proteínas se han eliminado hasta un nivel indetectable (por ejemplo, menos de 3 microgramos por 100 centímetros cuadrados), entonces las proteínas alergénicas también se han eliminado hasta un nivel muy bajo. En situaciones con múltiples alérgenos, como en el ejemplo del aderezo para ensaladas, si se determina que hay menos de 3 microgramos de proteína total, esto demuestra directamente que hay menos de 3 microgramos de proteína de cualquiera de las fuentes de alimentos alergénicos en una sola prueba. En última instancia, la elección de utilizar una prueba específica para el alérgeno o una prueba no específica depende de muchos factores. Entre ellos figuran la diferencia en el número y el tipo de alérgenos en los productos elaborados en la misma zona o línea de producción, el tiempo necesario para la prueba, la necesidad de resultados cuantitativos, la relativa aptitud técnica del operador y los requisitos de los clientes para los que se fabrican los productos.

Desarrollo de un programa de muestreo de alérgenos: La selección de los puntos de muestreo imita el mismo proceso que se utiliza para las pruebas de ATP y las pruebas de indicadores microbianos. Aunque la mayor parte de las pruebas para alérgenos deben centrarse en la verificación inmediata posterior a la limpieza de los puntos de prueba de las Zonas 1 y 2 antes de la puesta en marcha de la línea de producción, también resulta útil ejecutar pruebas periódicas de todas las zonas de muestreo ambiental para identificar las áreas de acumulación de polvo, líquido y otros residuos que puedan ocasionar un contacto cruzado. Para verificar la limpieza, se debe utilizar un enfoque basado en el riesgo que tenga en cuenta tanto el impacto sobre los alimentos, en caso de que una superficie se contamine (el peligro), como el nivel de dificultad para conseguir que la superficie se limpie adecuadamente (la probabilidad).



AgraQuant®
Histamine
(0.5-50ppb)
Test Kit

12. Gestión de resultados positivos: mitigación y acciones correctivas

	Etapa 1 Duda	Etapa 2 Conciencia	Etapa 3 Iluminación	Etapa 4 Prevención	Etapa 5 Predicción
Resultados del muestreo	No se realizan pruebas o solo se realizan las necesarias para cumplir los requisitos regulatorios. Lamentable-mente, el muestreo se suele realizar de un modo que no detecta *Listeria*.	Positivos en las superficies de contacto y los productos	Muestreo ampliado y regular de las superficies de contacto y los sitios ambientales. Positivos intermitentes en las superficies de contacto. Positivos habituales en sitios ambientales.	Los resultados positivos de la fase de Prevención temprana están dominados por sitios indicadores como el enjuague posterior. En la fase final de Prevención, hay muy pocos resultados positivos en las superficies de contacto. No hay positivos en los productos. Los resultados positivos en las instalaciones de investigación dominan el área de procesamiento listo para el consumo (RTE, ready-to-eat).	No hay positivos en la superficie de contacto. Predominan los positivos de la Zona 4. El muestreo de los puntos de transferencia con barreras arroja escasos positivos.
Métodos de control		Tomar muestras del producto. Reconocer la naturaleza ambiental de *Listeria*.	Reconocer la existencia de nichos de crecimiento. Tomar muestras de las superficies de contacto y algunas áreas del suelo y del entorno. Iniciar la fase de rediseño.	Mapeo de nichos de crecimiento potenciales. Se programan algunas prácticas de intervención en el sitio. Gestionar los "factores críticos" del proceso de saneamiento. Participación en el rediseño de equipos y plantas.	Muestreo agresivo de alerta temprana en el lugar. Prácticas de intervención en el lugar con todo el equipo de procesamiento RTE. Enfoque en la Zona 4 y las plantas. Fases avanzadas de rediseño de equipos y plantas.
Verificación		Tomar muestras del producto.	Tomar muestras del producto y las superficies de contacto.	Tomar muestras del producto, de las superficies de contacto y de los vectores primarios de transferencia en el área RTE.	Tomar muestras del producto, superficies de contacto y puntos de transferencia (Zonas 1, 2, 3) en

En todos los casos que aparezcan resultados positivos a la investigación de patógenos llevada a cabo, la autoridad competente requerirá al operador de la industria alimentaria que investigue la causa de la contaminación y garantice el cumplimiento de los criterios microbiológicos en el producto. Serán necesarias medidas correctoras para evitar la repetición de la no conformidad. El operador, en caso de desacuerdo con los resultados del muestreo oficial, tendrá siempre derecho, y así se le hará saber, a un segundo examen pericial.

Los establecimientos que produzcan alimentos RTE o ALC cuyo análisis de peligros haya determinado que son susceptibles de plantear un riesgo de *Listeria monocytogenes* deberán contemplar medidas de control para este riesgo y, en el caso de que tengan que tomarlas ante alguna no conformidad, registrarlas. Este requerimiento es básico y no compromete el objetivo de simplificación que persiguen las Guías de Buenas Prácticas bajo las que garantizan la seguridad alimentaria de sus productos. Las medidas que aplique el operador se tienen que basar en evidencias y en los resultados de la investigación de las causas para poder ser objetivas, eficaces y proporcionadas. El operador contemplará en su sistema de gestión de la seguridad alimentaria, las medidas a tomar en función de si el resultado insatisfactorio corresponde a una superficie de contacto posterior al tratamiento letal o no.

En el caso de que los tratamientos y/o procesos que reciba el producto para garantizar su seguridad alimentaria sean subletales (curado, salazón, acidificación, nitrificación) y estén controlados mediante un punto de control o un PCC, las medidas a tomar serán las que tenga previstas para esas desviaciones y se adecuarán, con carácter general, a los puntos siguientes y, en particular, con las medidas específicas resultantes del estudio de causas.

Estudio de causas de la contaminación: Tiene carácter previo y el operador, para realizar su plan de actuación, se habrá basado en su estudio de causas teniendo en cuenta los resultados históricos de superficies muestreadas y de los distintos registros obrantes en su autocontrol, que entre otros pueden ser:

- Registros de producción del lote/s concernidos, particularmente si existen puntos de control críticos (PCCs) en tratamientos térmicos u de otro tipo.
- Registros de verificación de la última limpieza y desinfección efectuada.
- Registros de los Preoperativos y Operativos realizados. Se revisarán los registros de su Plan de Limpieza y Desinfección, o en su caso, del Programa Normalizado de Control de la Higiene.
- Registro de Incidencias.
- Entrevistas con el personal que ha participado en la limpieza y el procesado. También con el encargado de planta.

Detección de *L. monocytogenes* en superficie de contacto con productos alimenticios posterior al tratamiento letal y en superficies de contacto con alimentos procesados sin etapa de letalidad: Ante un resultado insatisfactorio de *Listeria* en superficie de contacto con producto posterior al tratamiento letal o en superficies de contacto con productos procesados sin etapa de letalidad, el operador, entre otras medidas que considere necesario incluir en su plan de actuación, deberá mostrar:

- Evidencias de la parada del equipo afectado, línea de producción o instalación tras el positivo.
- Identificar lotes de productos elaborados/envasados/reenvasados en el equipo, línea de producción o instalación desde la toma de muestra hasta la inmovilización efectiva.

- Evidencias de la verificación analítica de dichos lotes con un muestreo representativo en función de la cantidad y tipología de productos fabricados/envasados/reenvasados.
- Evidencias de la adopción de medidas extraordinarias de Limpieza y Desinfección de los equipos y de la línea de producción.
- Evidencias de análisis negativo en superficies de contacto antes de la reanudación de la actividad.
- Evidencias de refuerzo temporal de los muestreos de verificación en producto, superficie de contacto y ambientales.

Detección de *L. monocytogenes* en superficie de contacto previa al tratamiento letal del producto alimenticio o en superficie sin contacto con alimento: Ante un resultado insatisfactorio en superficie de contacto previa al tratamiento letal, o en otras superficies sin contacto directo con alimentos (ambientales), el operador, entre otras medidas que considere necesario incluir en su plan de actuación, deberá mostrar:

- Evidencias de la adopción de medidas extraordinarias de L+D de equipos y líneas de producción.
- Evidencias del refuerzo temporal de muestreos de verificación en productos y superficies.
- Comprobaciones los registros de verificación de la última L+D efectuada.

Si el análisis del producto confirma la contaminación y el incumplimiento del criterio de seguridad alimentaria respecto a *Listeria monocytogenes,* el operador tendrá que aplicar acciones que deberán estar recogidas en su sistema de gestión de la seguridad alimentaria como ser:

- Identificación del producto contaminado.
- Retirada de la comercialización del producto contaminado.
- Estudio de causas.
- Puesta en marcha de acciones correctoras.
- Restablecimiento de las condiciones adecuadas para garantizar la seguridad del producto.

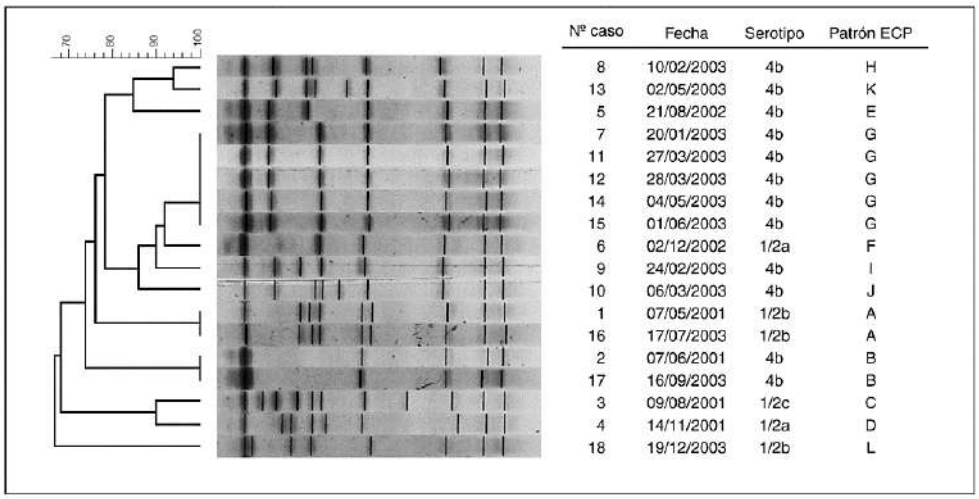
Un aspecto importante habrá sido la determinación del producto que puede estar afectado por la contaminación en zonas y equipos. El criterio estará establecido en el procedimiento de autocontrol del operador y, en su ausencia, se puede considerar contaminado el producto elaborado desde la última limpieza y desinfección que según constancia registral se considere bien aplicada y, a ser posible, verificada.

En todos los casos, en las acciones correctoras se habrá procedido a la aplicación de un plan de limpieza y desinfección de choque frente a *Listeria* que aporte garantías de la eliminación de la contaminación. Este plan debe estar ya previsto en las industrias de riesgo, contemplando los procedimientos de limpieza y biocidas activos frente a *Listeria monocytogenes.* Estas actuaciones específicas deben terminar con verificación analítica satisfactoria por parte del operador económico (ausencia de *Listeria* en las superficies que habían resultado positivas).

Las decisiones tienen que estar suficientemente avaladas y disponer de evidencias objetivas, como son los boletines analíticos. En cuanto al destino del producto contaminado, se pueden contemplar las siguientes posibilidades:

Reprocesado: Se podrá realizar únicamente en el caso de que el producto se encuentre aún en el propio establecimiento alimentario, o en productos comercializados que todavía no estén a nivel de comercio al por menor, ya que no es posible aplicarlo en alimentos ya distribuidos al comercio minorista. Estos reprocesos deben estar previstos en el autocontrol y justificados técnicamente, pudiendo aplicar un nuevo tratamiento letal o que el alimento adquiera unas características físico-químicas que eliminen el riesgo de *Listeria.* La empresa debe presentar evidencias de que el producto cumple el criterio de seguridad alimentaria correspondiente, de acuerdo con la legislación en vigencia. Las autoridades competentes, en el marco de los controles oficiales efectuados sobre los establecimientos, valorarán la idoneidad de estos procedimientos y la empresa tendrá que presentar evidencias de que adopta medidas para que, durante las operaciones de reprocesado, no se vuelvan a contaminar las instalaciones.

La **Norma Internacional ISO 18593**, por la que se describen métodos de muestreo de superficies para la detección y el recuento de microorganismos viables, no aporta directrices suficientes ni recomendaciones específicas para la detección de L. monocytogenes. En el caso de la L. monocytogenes, los métodos de muestreo mediante frotado (hisopos y esponjas/técnica del paño) son los únicos que se consideran adecuados. La norma ISO no precisa el momento en el que el muestreo debe llevarse a cabo o cuáles son las zonas de las que hay que tomar muestras. Tras el muestreo, el análisis de las muestras se efectuará de conformidad con la **Norma ISO 11290-1** u otros métodos validados alternativos. En caso de que se detecten muestras con un resultado positivo para L. monocytogenes en sucesivas campañas de muestreo en una misma planta procesadora en la que ya se han tomado medidas preventivas, será necesario realizar la subtipificación de las cepas aisladas de L. monocytogenes mediante un método molecular (electroforesis en gel de campo pulsado, análisis en múltiples loci mediante repeticiones en tándem de número variable o análisis mediante fluorescencia de los polimorfismos de la longitud del fragmento amplificado) a fin de determinar si las cepas aisladas pertenecen a un único tipo y, por tanto, es persistente.



Nº caso	Fecha	Serotipo	Patrón ECP
8	10/02/2003	4b	H
13	02/05/2003	4b	K
5	21/08/2002	4b	E
7	20/01/2003	4b	G
11	27/03/2003	4b	G
12	28/03/2003	4b	G
14	04/05/2003	4b	G
15	01/06/2003	4b	G
6	02/12/2002	1/2a	F
9	24/02/2003	4b	I
10	06/03/2003	4b	J
1	07/05/2001	1/2b	A
16	17/07/2003	1/2b	A
2	07/06/2001	4b	B
17	16/09/2003	4b	B
3	09/08/2001	1/2c	C
4	14/11/2001	1/2a	D
18	19/12/2003	1/2b	L

Dar respuesta a un resultado positivo requiere:

- ✓ Aislar y limitar el tránsito dentro y alrededor del área. Volver a tomar muestras del área representada por la muestra positiva.
- ✓ Realizar una investigación exhaustiva y análisis de riesgo del área.
- ✓ Realizar un muestreo vectorial en la primera oportunidad, si es posible antes de la limpieza, para determinar mejor la fuente de contaminación.
- ✓ Limpiar el área afectada.
- ✓ Determinar la causa que originó el problema e implementar acciones correctivas a largo plazo para la causa original y las causas coadyuvantes. En caso de que se deban postergar las medidas correctivas a largo plazo, se deben tomar medidas de mitigación y acciones provisionales para prevenir la propagación y/o contaminación del producto o superficies de contacto con producto.
- ✓ Determine si se justifican analizar producto terminado con base en la cercanía del área con resultado positivo y producto terminado expuesto.

La respuesta inmediata a un resultado positivo consiste en volver a tomar muestras **exhaustivas** del área o equipo, con el fin de determinar el sitio específico, sobre todo si la muestra que se analizó era una muestra compuesta. De ser posible, restrinja el acceso al área para prevenir el desplazamiento del patógeno hacia otras áreas de la instalación. Es posible que se deba desarmar el equipo para inspeccionarlo y limpiarlo completamente. Luego, limpie y sanitice a fondo el área afectada. Al limpiar el área, verifique que los procedimientos estándar son adecuados para el equipo y área que se va a limpiar. Es necesaria la acción mecánica (tallado a mano) para eliminar los biofilms.

Realice un muestreo vectorial del área para determinar cómo pudo haber sido introducido el organismo, pero tenga cuidado de no propagar cualquier posible contaminación. Revise arriba, abajo y en todas las direcciones (360 grados) para detectar posibles fuentes. La investigación debe incluir una revisión de fugas, grietas, juntas metálicas (soldadas o atornilladas), baldosas rotas o sueltas, áreas huecas, unidades de control del aire y flujo del aire. Incluya en la investigación tanto los equipos fijos como los provisionales. Asegúrese de incluir patrones de tránsito en el área, ya que representan una posible fuente, así como un riesgo de llevar el organismo hacia otras áreas. El análisis debe incluir inspecciones con el uso de sus sentidos (vista, olfato, tacto), así como un régimen de muestreo de investigación para ayudar a ubicar la fuente. El muestreo de seguimiento se realiza después de la limpieza (consulte la barra lateral).

Si se encuentran **reiteradamente resultados positivos de *Listeria* spp. o *Lm*** en un área de producto RTE, cerca de o en la Zona 1, para los que no se ha identificado la causa, **se recomienda encarecidamente que la instalación suspenda su producción**, identifique las causas y tome medidas correctivas antes de reanudar la producción. Cuando un análisis muestra la presencia de *Lm* en producto, este se considera adulterado y se debe detener su comercialización. Si ya se ha despachado una parte de la producción, ésta se debe retirar del mercado.

Las condiciones anteriores pueden indicar una pérdida del control y la instalación debe incorporar a profesionales de inocuidad alimentaria internos o externos, para que dirijan y promuevan la resolución de problemas y las acciones correctivas.

- Las salmueras de queso están en contacto directo con el producto, y deben considerarse como Zona 1. *Listeria* puede sobrevivir en las condiciones frías y salinas de las salmueras de queso, por lo que éstas requieren atención especial. Las salmueras y los equipos de salmuera deben estar limpios y en condiciones sanitarias.
- Los estantes, mesas y demás superficies que se usan para madurar o escurrir quesos no empacados y otros productos lácteos, se consideran como Zona 1 y deben mantenerse de forma sanitaria.
- Cuando las salmueras, estantes de maduración, mesas y demás superficies de contacto con producto se someten a análisis para un indicador como *Listeria* spp., la gerencia de la empresa debe tener una idea clara de las implicaciones para el producto en caso de obtener un resultado positivo en el análisis. El producto se debe retener hasta que se reciban los resultados negativos.

La verificación del PMA debe ser un proceso de rutina que involucre la revisión de todos los elementos, resultados, acciones correctivas y documentación del programa. Incluye una inspección visual de la ejecución del programa para garantizar que se cumplan todas las etapas necesarias, de forma adecuada y en su totalidad. La verificación del programa, puede incluir actividades que apliquen al programa en general, o a una línea/área específica. Entre los elementos que deben revisarse se encuentran:

Revisión de la metodología

- ¿El programa de monitoreo incluye la cantidad de muestras, ubicaciones, frecuencia y momento del muestreo adecuadas?
- ¿Se cumple el procedimiento de muestreo adecuado y se toman muestras en la ubicación correcta?
- ¿Las muestras se manipulan y entregan al laboratorio de forma correcta?
- ¿Se utilizan los métodos adecuados (métodos analíticos)? ¿Se cumplen debidamente?

Revisión de los registros y resultados

- ¿Los documentos, registros y resultados presentados (incluso las revisiones/autorizaciones requeridas) son precisos y completos?
- ¿Hay documentos o registros de respuesta para todos los hallazgos y acciones correctivas?
- ¿Las revisiones periódicas de los resultados han identificado alguna tendencia o problemas repetidos?
- ¿Se implementaron y cumplieron las acciones correctivas?
- ¿Los registros muestran que las acciones correctivas recuperaron el control de forma eficaz?

Identificar modificaciones al plan de muestreo en respuesta a:

- Resultados/tendencias/problemas repetidos.
- Circunstancias especiales.
- Cambios al producto, proceso, equipo, y/o entorno de la planta.

Se deben mantener registros de los mapeos, planes, resultados y acciones correctivas del muestreo. Estos son útiles para evaluar la eficacia del plan y propician revisiones válidas para hacer mejoras. Como en todos los registros, deben tener fecha, estar firmados y ser rastreables hasta la instalación y línea de procesamiento. Durante la verificación, se pueden realizar más muestreos en sitios adicionales y/o distintos para demostrar que el muestreo de rutina ha sido eficaz. También se pueden utilizar análisis de producto terminado. Otras actividades pueden incluir la participación de un consultor especializado externo o la revisión de materiales publicados. A los efectos de entender mejor la problemática, plantearemos un caso práctico:

Contaminación ambiental que resulta en presuntos positivos: *La instalación recibe distintos quesos naturales y otros materiales microbiológicamente susceptibles para hacer queso procesado. La mezcla y el empaquetamiento se realizan en una sala de alto grado de higiene, donde el producto se empaca en frío. La línea de empaquetamiento se limpia en húmedo diariamente. Dado que el producto se empaca en frío y se expone durante el empaquetamiento, el programa de monitoreo ambiental de patógenos incluye muestreos para análisis de Listeria spp en las Zonas 1, 2, 3 y 4., muestreos que se realizan durante operaciones (al menos 4 horas después del inicio de la producción). Cuando se muestrean superficies de Zona 1, todo el producto se retiene a la espera de los resultados negativos. En una de las muestras de la zona 3, una muestra de piso de la sala de empaquetamiento, se obtuvo un resultado presunto positivo para Listeria spp. Se tomaron acciones correctivas limpiando con espuma y restregando todo el piso, antes de la aplicación de un desinfectante a base de ácido peroxiacético. En todos los muestreos de seguimiento se obtuvieron resultados negativos (tres series consecutivas) para Listeria spp.*

Luego, aproximadamente un mes después, se obtuvo otro resultado presunto positivo para Listeria spp. en una muestra de piso. Se tomaron acciones correctivas similares, y los muestreos de seguimiento mostraron otro resultado positivo para Listeria spp. en la Zona 3. Todos los resultados del muestreo de seguimiento de la Zona 2 fueron negativos. Después de las acciones correctivas, las primeras dos series de los muestreos de seguimiento fueron negativas; sin embargo, en la tercera serie, una muestra resultó presuntamente positiva para Listeria spp, lo que llevó a más muestreos de seguimiento. Algunas muestras de seguimiento de la Zona 3, realizados durante operaciones, resultaron presuntos positivos para Listeria spp. Todas las muestras ambientales para Listeria spp., tomadas después de la limpieza, pero antes de operaciones, fueron negativas.

Al mapear los resultados y observar la producción, el equipo de inocuidad alimentaria notó que había agua goteando sobre el piso y a través de una pieza de un equipo periférico, antes de drenar cerca del producto expuesto. El equipo de sanitización tenía muy poco acceso para limpiar por debajo del equipo periférico y se observaron daños en piso con cobertura epóxica de esa área.

Como acciones preventivas, el equipo colocó una barrera provisional durante la producción, lo que impidió que el agua goteara sobre el piso, y realizó sanitizaciones periódicas del piso con desinfectante peroxiacético durante operaciones (nota: el peróxido de hidrógeno en polvo también es una opción que ayudaría a mantener el área seca). Después de la aplicación de estas medidas preventivas, todas las muestras ambientales fueron negativas para Listeria spp. Como acciones correctivas, el personal de mantenimiento reparó la fuga, selló el equipo periférico con el piso y revistió el piso.

Si nunca se detecta *Listeria spp.,* entonces se debe revisar nuevamente el programa de muestreo. Entre los posibles motivos por los que no se detecta *Listeria spp* se encuentran:

- Probablemente los procedimientos de muestreo y/o prueba no son lo suficientemente rigurosos o sensibles.
- Asegúrese de que se han identificado y muestreado los posibles puntos de albergue microbiano.
- Asegúrese de que se han seleccionado los momentos y frecuencias de muestreo para detectar *Listeria*.
- Asegúrese de que se cumplan los procedimientos de muestreo y que el tamaño del área muestreada sea adecuado.
- Insuficiente neutralización de los restos de desinfectante en las áreas muestreadas.
- Manipulación deficiente de las muestras antes de realizar los análisis.
- Métodos de análisis incorrectos o poca experiencia del técnico.
- Alteración del muestreo o de los análisis para obtener resultados negativos.

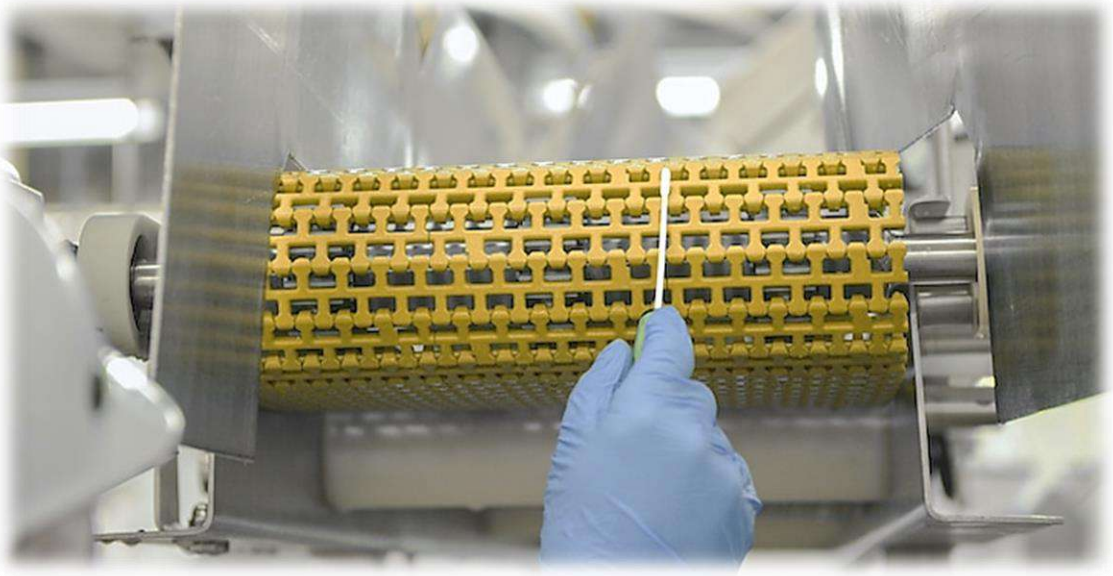
Vamos a plantar al respecto, otro nuevo **caso práctico:** *Se informó a un fabricante de quesos de especialidad, que en un muestreo aleatorio realizado por parte de una agencia oficial se identificó Lm en un producto muestreado en un punto de venta al menudeo. El producto aún se encontraba en el plazo de caducidad y se obtuvo de envases cerrados. Un muestreo adicional en el refrigerador del almacén del fabricante identificó más producto con resultados positivos para Lm. Se puso en marcha un retiro total del producto del mercado. El fabricante tenía varios controles muy buenos y parecía ser muy meticuloso con sus procedimientos de sanitización.*

Después de realizar un muestreo exhaustivo de seguimiento, se identificó la presencia de Lm en una pequeña grieta en el techo sobre el tanque abierto de salmuera. La cepa aislada de la grieta tenía el mismo perfil genético que la cepa de Lm aislada del queso contaminado. La grieta solo podía verse desde una escalera de mano sobre el área de salmuera. Se informó que el techo se limpiaba todos los días después de empacar el queso. La salmuera se analizó y se encontró la presencia de la misma Lm identificada en el producto y en la grieta.

Además, un punto en el piso debajo del tanque de salmuera se encontró positivo para la misma cepa encontrada en el producto, en la grieta del techo y en la salmuera. Una revisión exhaustiva del programa de monitoreo ambiental identificó el problema en las áreas elevadas, incluyendo el techo de la sala de producto RTE, y se agregó al plan de monitoreo de rutina. También se descubrió que, durante la sanitización, se lavaba el techo usando una manguera de agua a presión, y el aerosol y escurrimiento caían dentro de la salmuera destapada. Esto se identificó como la posible fuente de contaminación con Lm. La salmuera también salpicó algunas veces el piso, y es probable que lo contaminara.

Acciones correctivas y acciones preventivas:

- *Se retiró el producto del mercado.*
- *Se identificó el problema de infraestructura, la grieta del techo (que pudo haber sido identificada mediante inspecciones periódicas), como problema importante debido a que se encontraba sobre la salmuera destapada. El propietario estableció inmediatamente inspecciones periódicas de las áreas elevadas.*
- *Se entregaron cepillos y trapeadores a los trabajadores, adecuados para el techo y las áreas elevadas, y se prohibió el uso de mangueras con agua a presión. Además, se redujo la presión de todas las mangueras de limpieza. Ahora se usa un desinfectante duradero después de limpiar las áreas elevadas.*
- *Se estableció una nueva medida preventiva que consiste en cubrir la salmuera durante la sanitización para prevenir contaminación con líquidos limpiadores o salpicaduras provenientes de áreas sin contacto con alimentos.*



Un patógeno positivo o presunto positivo en cualquier zona de su Programa de Monitoreo Ambiental (EMP) debe desencadenar una acción correctiva. A medida que avanza en su plan de acción correctiva, asegúrese de que se documente detalladamente todas las investigaciones realizadas, los pasos dados e incluya una descripción completa del desencadenante. Ayuda a definir una parte o persona responsable que pueda encargarse de iniciar, completar y documentar las acciones correctivas.

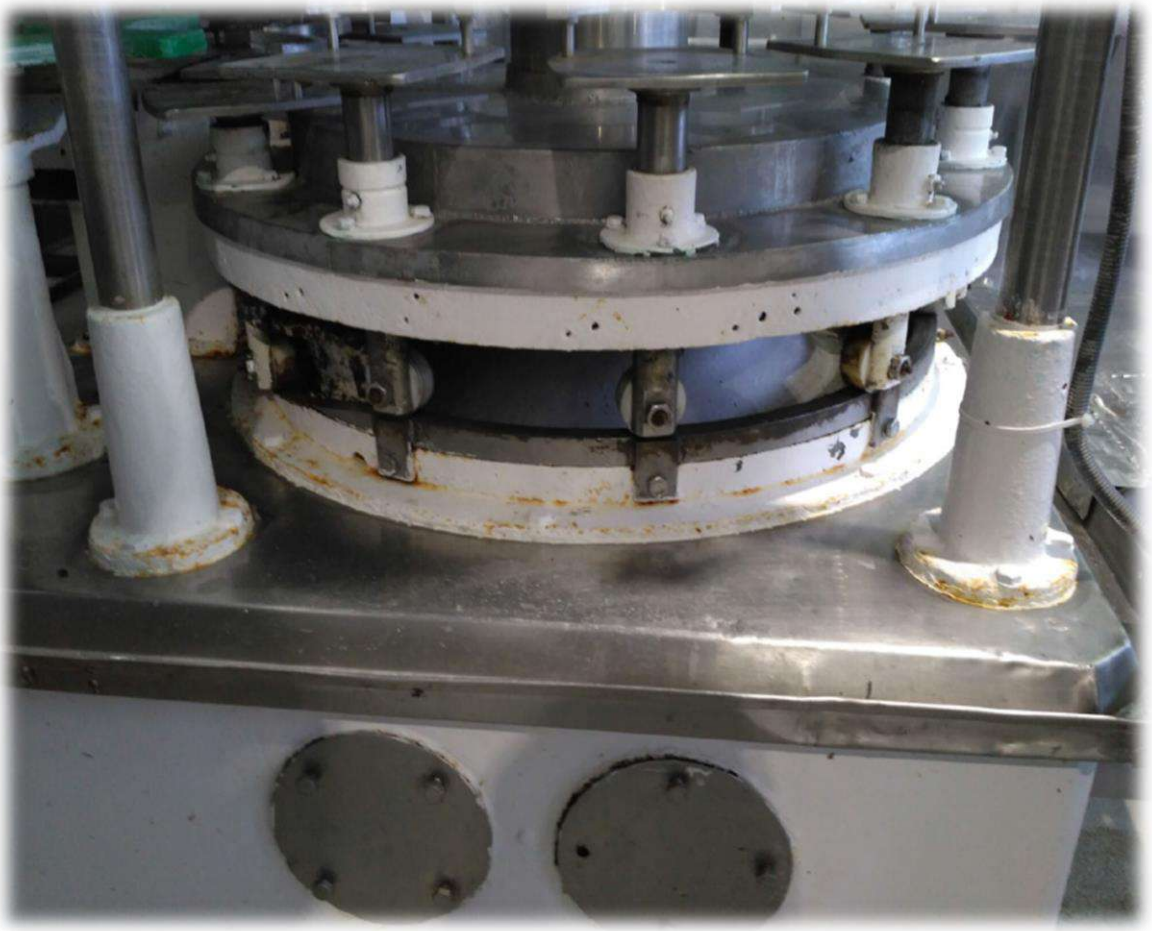
Si bien las instalaciones reguladas por la FDA no necesitan realizar pruebas de patógenos en la zona 1, las instalaciones reguladas por el USDA deben realizar pruebas en la zona 1 para detectar patógenos o especies de patógenos. La acción correctiva debería considerar los insumos requeridos dependiendo del organismo regulador. El USDA requiere limpieza intensificada y saneamiento inmediatamente después de una muestra positiva de un patógeno. Las instalaciones reguladas por la FDA deben seguir pasos similares a los recomendados por el USDA. Empiece por identificar todos los posibles sitios de refugio y vías de contaminación cruzada en sus instalaciones. Considere las rutas de tráfico de los empleados o el equipo de movimiento de productos, como transpaletas y montacargas, durante este proceso.

A continuación, desmonte y limpie completamente el equipo. Los medios de saneamiento dependen del diseño sanitario de su maquinaria. La limpieza intensificada siempre debe incluir limpieza profunda, aplicación de alta concentración de desinfectante en el equipo afectado y áreas circundantes con un tiempo residual adecuado, y luego enjuague y aplicación final de desinfectante a concentración normal. Si continúa viendo resultados positivos de patógenos, es posible que deba reparar o reemplazar el equipo en cuestión.
Tenga en cuenta que las áreas de producción circundantes y el equipo de apoyo están sujetos a actividades adicionales de control y limpieza. Considérelos como áreas de refugio potenciales hasta que su acción correctiva resulte exitosa.

Mire el tamaño de su operación y el tipo de productos que produce para determinar qué tipo de método de muestreo de seguimiento promulgará como parte de su plan de acción correctiva. El método elegido debe incluir de 2 a 3 series de frotis realizados en los días posteriores a un resultado positivo inicial. Al limpiar estas áreas, considere la posibilidad de vectorizar. El hisopado de vectores es un método que se basa en la ubicación de la muestra positiva original. Durante este proceso, es posible que deba poner en cuarentena el área de cualquier tráfico de personal o movimiento de productos para evitar cualquier contaminación adicional.

Si una prueba de la zona 1 en su instalación recibe una muestra de patógeno positiva, considere si todos los productos terminados afectados deben colocarse en espera o en cuarentena después de la desinfección, en espera de la acción correctiva y los resultados de la nueva prueba. Por supuesto, para eliminar realmente las bacterias dañinas y mitigar el riesgo, necesita conocer la fuente de origen. En otras palabras, debe determinar la causa subyacente de la situación. ¿Dónde se originaron las bacterias? ¿Cómo entró en sus instalaciones?

Si se encuentra una fuente raíz que no está incorporada en su acción correctiva, es muy probable que la acción correctiva resulte ineficaz. Considerar siempre análisis de causa raíz como parte de sus acciones correctivas, no como un paso a seguir después del hecho. Para asegurarse de que no se está luchando constantemente contra los mismos problemas en el piso de producción, se deben implementar acciones correctivas exhaustivas. Después de detectar un patógeno, tenga cuidado de desinfectar el área y el equipo circundante más allá de las rutinas de limpieza diarias. Es posible que deba poner en cuarentena el área mientras llega a la raíz del riesgo y realizar nuevas pruebas hasta que los resultados negativos demuestren que la bacteria ya no está presente en su instalación.



ANEXOS

Cuadro A4-1. Condiciones que limitan la proliferación de organismos patógenos

Organismo	Temperatura °C (°F)			pH			Actividad acuosa (aw)			Conc. máx. de sal en fase acuosa
	Mínima	Óptima	Máxima	Mínimo	Óptimo	Máximo	Mínima	Óptima	Máxima	
Bacillus cereus	4 (39)	30-40 (86-104)	55 (131)	4.3	6.0-7.0	9.3	0.92	-	-	10
Campylobacter	32 (86)	42-43 (108-109)	45 (113)	4.9	6.5-7.5	9.5	> 0.987	0.997	-	1.7
Clostridium botulinum - Proteolítico (ABF)	10 (50)	35-40 (95-104)	48 (-118)	4.6	-	9	0.935	-	-	10
- No proteolítico (BEF)	3.3 (38)	28-30 (82-86)	45 (113)	5.0	-	9	0.970	-	-	5
Clostridium perfringens	10 (50)	43-47 (109-117)	50 (126)	5	7.2	9.0	0.93	0.95-0.96	>0.99	7
Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC)	6.5 (44)	35-40 (95-104)	49.4 (121)	4	6-7	10	0.95	0.995	-	6.5
L. monocytogenes	-0.4 (31)	37 (99)	45 (113)	4.4	7.0	9.4	0.92	-	-	10
Salmonella	5.2 (41)	35-43 (95-109)	46.2 (115)	3.7	7-7.75	9.5	0.94	0.99	>0.99	8
Shigella	6.1 (43)	-	47.1 (117)	4.8	-	9.3	0.96	-	-	5.2
Staph. Aureus - proliferación (anaerobia)	7 (45)	37 (99)	50 (122)	4	6-7	10	0.90 (0.83)	0.98	>0.99	20
- toxina (anaerobia)	10 (50)	40-45 (104-113)	48 (118)	4	7-8	9.8	0.85	0.98	>0.99	10
Streptococcus grupo A	10 (50)	37 (99)	<45 (<113)	4.8-5.3	7	>9.3	-	-	-	6.5
Vibrio spp.	41 (5)	37 (99)	45.3 (114)	4.8	7.6-8.6	11	0.94	0.91-0.99	0.998	10
Yersinia enterocolitica	-1.3 (30)	25-37 (77-99)	42 (108)	4.2	7.2	10	0.945	-	-	7

Obtenido de FDA, 2011, *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, 4ª edición, y la International Commission on Microbiological Sprecifications for Foods. 1996, Microorganisms in Foods 5: *Microbiological Specifications of Food Pathogens*, Blackie Academic and Professional, Nueva York.

Cuadro A4-2. Guía de tiempo acumulado y temperatura para controlar la proliferación de organismos patógenos y la formación de toxinas en alimentos[1]

Condición potencialmente peligrosa	Temperatura del producto	Máximo tiempo de exposición acumulado
Bacillus cereus: proliferación y formación de toxinas	4-6 °C (39,2-43 °F) 7-15 °C (44-59 °F) 16-21 °C (60-70 °F) Por encima de 21 °C (70 °F)	Cinco días Un día Seis horas Tres horas
Campylobacter jejuni: proliferación	30-34 °C (86-93 °F) Por encima de 34 °C (93 °F)	48 horas Doce horas
Clostridium botulinum: germinación, proliferación y formación de toxinas: Tipo A y tipos proteolíticos B y F	10-21 °C (50-70 °F) Por encima de 21 °C (70 °F)	Once horas Dos horas
Tipo E y tipos no proteolíticos B y F	3.3-5 °C (37,9-41 °F) 6-10 °C (42-50 °F) 11-21 °C (51-70 °F) Por encima de 21 °C (70 °F)	Siete días Dos días Doce horas Seis horas
Clostridium perfringens: proliferación	10-12 °C (50-54 °F) 13-14 °C (55-57 °F) 15-21 °C (58-70 °F) Por encima de 21 °C (70 °F)	21 días Un día Seis horas[2] Dos horas
Escherichia coli: proliferación de cepas patógenas	6.6-10 °C (43,7-50 °F) 11-21 °C (51-70 °F) Por encima de 21 °C (70 °F	Dos días Cinco horas Seis horas
L. monocytogenes: proliferación	-0.4-5 °C (31,3-41 °F) 6-10 °C (42-50 °F) 11-21 °C (51-70 °F) 22-30 °C (71-86 °F) Por encima de 30 °C (86 °F)	Siete días Un día Siete horas Tres horas Una hora
Salmonella spp.: proliferación	5.2-10 °C (41,4-50 °F) 11-21 °C (51-70 °F) Por encima de 21 °C (70 °F)	Dos días Cinco horas Dos horas
Shigella spp.: proliferación	6.1-10 °C (43-50 °F) 11-21 °C (51-70 °F) Por encima de 21 °C (70 °F)	Dos días Cinco horas Dos horas
Staphylococcus. Aureus: proliferación y formación de toxinas	10 °C (50 °F) 11-21 °C (51-70 °F) Por encima de 21 °C (70 °F)	Catorce días Doce horas Tres horas[2]
Vibrio spp.: proliferación	10 °C (≤ 50 °F) 11-21 °C (51-70 °F) 22-27 °C (71-80 °F) Por encima de 27 °C (80 °F)	21 días Seis horas Dos horas Una hora[3]
Yersinia enterocolitica: proliferación	-1.3-10 °C (29,7- 50 °F) 11-21 °C (51-70 °F) Por encima de 27 °C (70 °F)	Un día Seis horas Dos y media horas

[1] Adaptado de FDA, 2011. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. 4ª edición; supone una alta actividad acuosa y un pH casi neutro.
[2] Se necesitan más datos.
[3] Aplica únicamente a los alimentos cocidos listos para consumir

Cuadro A4- 3-D Inactivacion de *Listeria monocytogenes*

Internal Product Temperature (OC)	Lethal rate	Time for 6D Process (minutes)
63	0.117	17.0
64	0.158	12.7
65	0.215	9.3
66	0.215	6.8
67	0.398	5.0
68	0.541	3.7
69	0.736	2.7
70	1.000	2.0
71	1.359	1.5
72	1.848	1.0
73	2.512	0.8
74	3.415	0.6
75	4.642	0.4
76	6.310	0.3
77	8.577	0.2
78	11.659	0.2
79	15.849	0.1
80	21.544	0.09
81	29.286	0.07
82	39.810	0.05
83	54.116	0.03
84	73.564	0.03
85	100.000	0.02

Nota: z=7.5^{0}C

Fuente: APPENDIX 4: Bacterial Pathogen Growth and Inactivation. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition - Agosto 2019.

13. PMA del aire: estudios y resultados

Lucretius en el año 55 a.C. observó las partículas de polvo brillando en un rayo de sol en una habitación oscura y concluyó que debían ser corpúsculos flotando en el aire; aunque fue necesario esperar hasta el descubrimiento del microscopio para ver que en el aire había microorganismos vivos. Las esporas de los hongos fueron vistas por Valerius Cordus en el siglo XVI, pero fue Micheli quién primero las dibujó observando las esporas de los mohos que se transmitían por el aire. Leeuwenhoek observa y describe por primera vez las bacterias en distintos ambientes y supone que *"Estos animáculos pueden ser transportados por el viento mediante el polvo que flota en el aire"*.

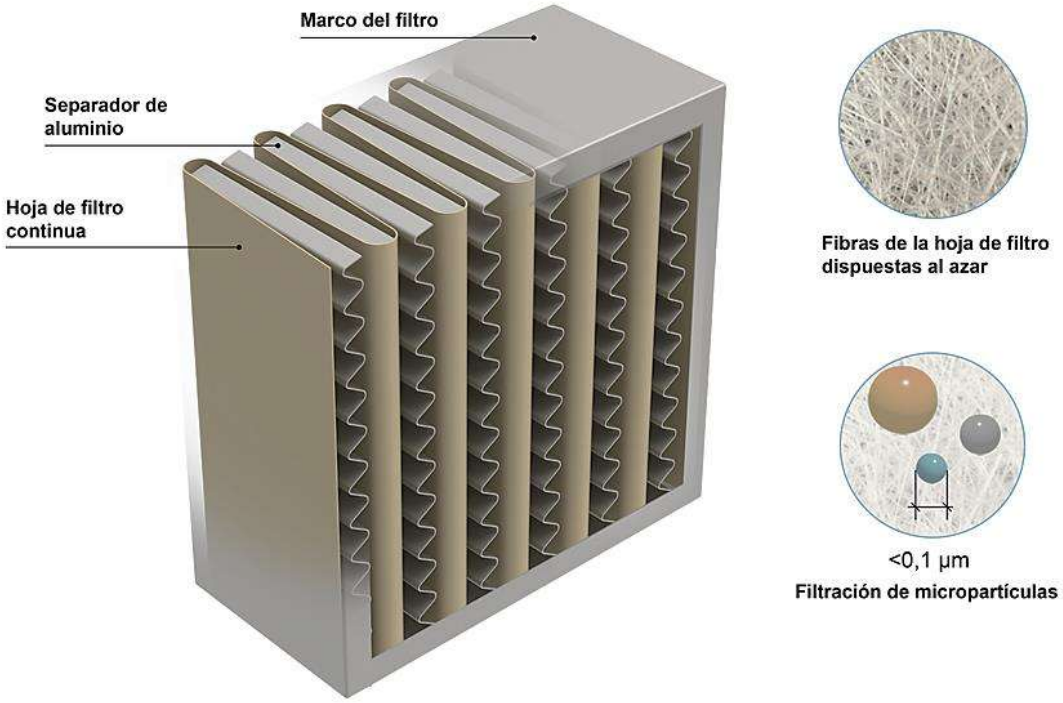
En 1855 Gaultier de Claubry inauguró una investigación científica en la que estudió los microorganismos reteniéndolos al hacer borbotear el aire en agua destilada. Pero fue Pasteur el que perfeccionó estos procedimientos realizando los primeros estudios precisos de las bacterias en el aire, demostrando así la no existencia de la generación espontánea. En aquella época uno de los motivos que incentivaron el estudio de los microorganismos del aire fue descubrir la causa de algunas enfermedades; como la epidemia del cólera que apareció en Europa en 1847. Varias investigaciones se realizaron para descubrir en el aire de los hospitales los gérmenes causantes de esta enfermedad.

Pierre Miquel fue sin duda el investigador que más estudió los microorganismos en el aire, realizando numerosos ensayos y creando una gran variedad de métodos de análisis, además de determinar la influencia de los diversos factores (temperatura, lluvia, corrientes de aire, altitud, número de personas etc.). En 1882 demostró que a medida que aumenta la altitud, disminuye el número de microorganismos. Para la época lo más difícil fue determinar el tipo de bacterias presentes en el aire, fueron Miquel y Cambert en 1901 quienes afirman que la mayoría de bacterias son saprófitas y proceden del suelo, encontrando una gran variedad, siendo las más frecuentes las bacterias cromógenas, los bacilos esporulados y los cocos.

La hipótesis de la existencia de bacterias en el aire llevó a Lister en 1867 a la utilización de pulverizaciones del aire con ácido carbólico para evitar la infección de las heridas quirúrgicas, comenzando así la época de la antisepsia en la cirugía. Posteriormente se demostró la presencia de varias bacterias patógenas, como Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Mycobacterium tuberculosis, etc. Y que, por lo tanto, a través de él podían transmitirse enfermedades infecciosas.

Ya en los años treinta, aparecen los trabajos de Wells, que realizó en numerosos ambientes de New York como las calles, hospitales y escuelas y descubrió la existencia de los "núcleos goticulares", demostrando que algunos microorganismos patógenos podían trasmitirse a grandes distancias y sobrevivir en el ambiente durante semanas o meses. La década de los años cincuenta se caracterizó por la aparición de una ciencia multidisciplinar, la Aerobiología, en la que se estudian los microorganismos del aire desde todos sus aspectos. Varios autores estudian la supervivencia de los microorganismos en los aerosoles tales como: Bacillus, Escherichia coli, Pseudomonas, Corynebacterium, Micrococcus, Serratia, Mycobacterium, Staphylococcus etc; algunos hongos como: Aspergillus y Pestalotia.

Un avance importante para el control de los microorganismos en ambientes cerrados, fue la utilización de los filtros para el aire de fibra de vidrio o de alta eficacia (HEPA), ampliamente utilizados en hospitales e industria farmacéutica para conseguir salas o zonas asépticas.



En la década de los setenta surge una mayor preocupación por el control del aire en los ambientes cerrados principalmente en los hospitales, industrias farmacéuticas y alimentarias. Así por ejemplo en 1969 la OMS dicta las primeras normas recomendadas para la fabricación y la inspección de la calidad de los medicamentos en los que se incluye el control microbiano del aire de los locales. Desde entonces el estudio microbiológico de estos ambientes ha ido en aumento, siendo actualmente práctica habitual e incluso obligatoria, el efectuar recuentos y controles periódicos del aire en las zonas estériles y limpias de hospitales, industrias de alimentos y farmacéuticas.

También suelen controlarse otros ambientes cerrados como fábricas de aparatos electrónicos, escuelas y edificios de oficinas. Este último caso, se debe a que, en los últimos años, se ha descrito una nueva enfermedad “El síndrome del edificio enfermo” que se produce en los ocupantes de determinados edificios. El origen de los síntomas, irritación de las membranas mucosas, dolor de cabeza, erupciones y dificultad respiratoria, no está aún muy claro, pero entre las posibles causas se citan factores ambientales, químicos y microorganismos. Actualmente nos encontramos en un periodo de gran interés en la microbiología del aire, lo que ha supuesto un desarrollo de la actividad investigadora en este campo.

Como ya sabemos, se conocen colectivamente con el nombre de microorganismos distintos grupos de organismos, la mayor parte de cuyos miembros son de dimensiones microscópicas. Se incluyen entre ellos organismos que difieren ampliamente entre sí en su forma, ciclo biológico y sus modos de vida. Las bacterias, son organismos unicelulares muy pequeños y relativamente sencillos, cuyo material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial. Por este motivo las bacterias se denominan procariotas. Las bacterias constituyen el reino llamado mónera. Las células bacterianas suelen presentar una morfología determinada entre varias posibles: bacilo (en forma de bastoncillo), coco (célula esférica u ovoide) y espirilo (en forma espiral o helicoidal. Pueden agruparse en parejas, cadenas, racimos u otras formaciones. Las bacterias están recubiertas por paredes celulares compuestas por una sustancia denominada peptidoglicano. Las bacterias se reproducen generalmente dividiéndose en dos células hijas iguales, proceso denominado fisión binaria. Para su nutrición la mayoría de las bacterias utiliza materia orgánica que puede obtenerse en la naturaleza a partir de microorganismos muertos o de un huésped vivo. Ciertas bacterias pueden formar sus propios nutrientes por fotosíntesis y algunas pueden nutrirse a partir de compuestos inorgánicos.

Los microorganismos que causan infecciones y enfermedades se denominan **patógenos** y las características que les permiten causar enfermedad se denominan factores de virulencia, la mayoría de estos factores protegen al microorganismo contra el ataque del huésped o median sus efectos perjudiciales sobre las células del huésped. El término patogenicidad refleja el grado de capacidad de causar enfermedad de un microorganismo; uno de patogenicidad elevada muy probablemente cause enfermedad cuando se encuentre con el huésped mientras que la probabilidad de que un microorganismo de patogenicidad baja provoque una infección es mucho menor. Cuando se produce la enfermedad los microorganismos muy virulentos a menudo causan graves daños en el huésped humano. El nivel de gravedad disminuye con la disminución de la virulencia del microorganismo.

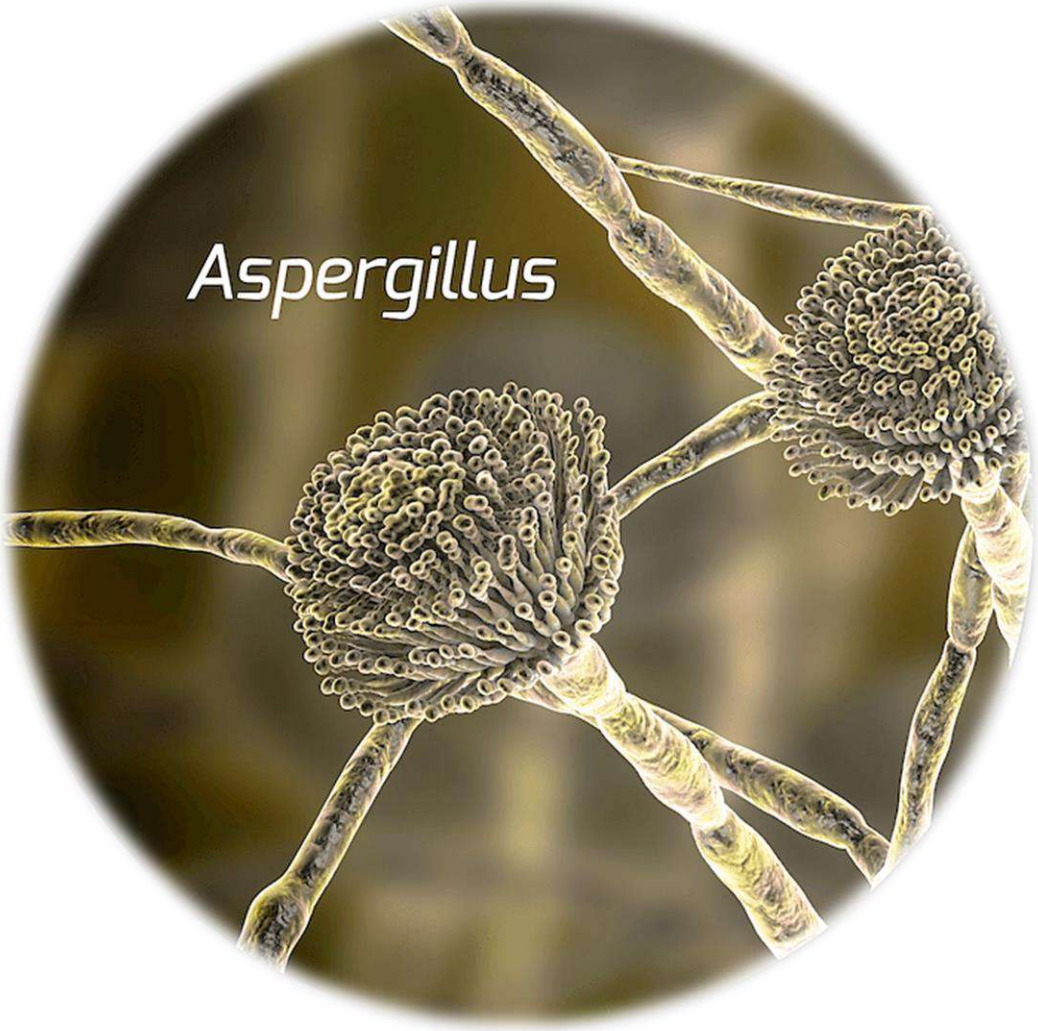
Los microorganismos que solo causan infecciones en presencia de la interrupción o el mal funcionamiento de uno o más mecanismos de defensa del huésped se conocen como patógenos oportunistas y las infecciones que causan se denominan como infecciones oportunistas. Por otro lado algunos patógenos que se sabe, causan infecciones graves, pueden ser parte de la flora normal de una persona y nunca causar enfermedades en esa persona. En cambio el mismo microorganismo puede causar infecciones potencialmente mortales cuando se trasmite a otra persona. Las razones de estas variaciones no se comprenden totalmente, pero estos resultados tan diferentes sin duda implican interacciones complejas entre el microorganismo y el ser humano.

A lo largo de nuestra vida, los humanos respiramos cerca de 500 millones de litros de aire, muchos de los cuales contienen polvo y gotas de humedad, en los que se encuentran presentes microorganismos; estos no crecen en el polvo pero pueden ser transitorios y variables, dependiendo del ambiente. Su nivel se controla naturalmente mediante el grado de humedad, tamaño y nivel de las partículas de polvo, la temperatura y la velocidad del aire, así como la resistencia de los microorganismos a las sequías. Por lo general, el aire seco con bajo contenido de polvo y una temperatura más alta tiene un nivel microbiano bajo.

Si el entorno contiene una fuente de patógenos por ejemplo granjas de animales y aves de corral, planta de tratamiento de aguas residuales, sector de manipulación de alimentos crudos, hospitales, entre otros; se pueden transferir diferentes tipos de bacterias incluidos patógenos y virus por medio del aire. Los microorganismos del aire proceden del suelo, del agua, de las plantas, de los animales y de otras fuentes. En el aire de ambientes exteriores predominan los microorganismos del suelo. En los interiores, la concentración de microorganismos es considerablemente más alta especialmente de los que derivan del tracto respiratorio humano.

Muchos microorganismos sobreviven con dificultad en el aire, y por ellos algunos patógenos solo se transmiten en los humanos en distancias cortas. No obstante otros patógenos resisten condiciones de sequedad y pueden permanecer vivos en el polvo durante largos periodos de tiempo. Durante el estornudo se genera un gran número de pequeñas gotas de líquido (microgotas de Flügge) y se produce un número considerable de ellas mientras tosemos o cuando simplemente hablamos. Cada pequeña gota infecciosa tiene un diámetro de unos 10 µm y puede quedar suspendida en el aire conteniendo una o dos células bacterianas. Debido a su pequeño tamaño estas gotas se evaporan rápidamente en el aire, dejando un núcleo de materia orgánica y de mucus al que se adhieren las bacterias.

Por su lado, la micología es la rama de la microbiología que se encarga de los hongos y sus enfermedades, las cuales comenzaron a estudiarse desde la más remota antigüedad. Los hongos son eucariotas, organismos cuyas células poseen un núcleo definido que contiene el material genético celular, rodeado por una membrana nuclear. Constituyen el reino Fungi, pueden ser unicelulares (microscópicos) o pluricelulares (macroscópicos). Pueden crecer en dos formas básicas: levaduras y mohos. Los hongos pueden reproducirse de forma sexual o asexual y se nutren absorbiendo materia orgánica en solución de su medio ambiente: suelo, agua o un huésped animal o vegetal. La mayor parte de los hongos se encuentran en la naturaleza y crecen con facilidad sobre fuentes simples de nitrógeno y carbono. Las infecciones causadas por hongos son las micosis. Las de mayor incidencia, la candidiasis y las dermatofitosis son causadas por hongos que forman parte de la flora microbiana normal o están muy adaptadas para sobrevivir en el huésped humano. Las micosis pueden clasificarse por conveniencia como superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas.



En general, las micosis superficiales se generan por contacto directo con el hongo o con una persona o animal infectado, y afectan la piel, ojos, senos, bucofaringe, oído externo, vagina entre otros. Por lo general las micosis subcutáneas se adquieren del ambiente, y el hongo penetra por un traumatismo en la piel. En las micosis sistémicas las esporas del hongo penetran por inhalación, después ocurre la colonización y en la mayoría de personas hay una infección pulmonar asintomática. Las micosis oportunistas son causadas por hongos saprobios que se transforman en patógenos.

De todos los microorganismos presentes en la atmosfera, las esporas de los hongos (células encargadas de la reproducción) representan el grupo más numeroso. La inhalación de esporas fúngicas puede desencadenar una variedad de síntomas respiratorios, como rinitis alérgica, asma, bronquitis crónica, entre otras. Dichas enfermedades dependen de la especie, las condiciones del medio en el que se desarrolla el hongo, el clima, y la actividad inmunológica del sujeto. Las estimaciones del número mundial de especies de hongos son muy variables, pero existen por lo menos un millón y probablemente alcancen los cinco millones. Su presencia en la atmosfera ha sido demostrada por su crecimiento en medios de cultivo, denominándose cultivables, sin embargo, se considera que es una pequeña parte de la población que es aerotransportada, dado que la mayoría podría estar muerta o encontrarse en forma viable no cultivable.

Factores como la temperatura, la humedad relativa del aire y la exposición a la luz solar y la lluvia pueden disminuir rápidamente el proceso de dispersión de las esporas. Algunas enfermedades fúngicas transmitidas por el aire, son responsables de enfermedades pulmonares, desde donde pueden invadir otros tejidos y producir una enfermedad sistémica. Por otra parte las esporas de varios mohos causan reacciones de hipersensibilidad que afectan el aparato respiratorio superior. El desarrollo de microorganismos en el aire, está influenciado por su puesto por factores físicos tales como humedad relativa, temperatura, oxigeno, materia orgánica, ventilación, polvo, entre otros, pero lo primero que determina que una bacteria o un hongo se mantenga en el ambiente viable, es la cantidad de agua disponible que existe.

La humedad relativa del ambiente, es el factor más importante. Cuando la misma decrece, disminuye el agua disponible para los microorganismos, lo que causa deshidratación y por lo tanto la inactivación de muchos de ellos. La desecación puede causar una pérdida de viabilidad en las capas más bajas de la atmósfera. El límite menor para el crecimiento de hongos es del 65% de humedad relativa; mientras que las bacterias requieren un porcentaje mayor Por su parte, la temperatura, está muy relacionada con la humedad relativa, por lo que es difícil separar los efectos que producen ambas. A bajas temperaturas inclusive las de congelación, no se destruyen los microorganismos, solo se impide su multiplicación. Diversos estudios muestran, que el incremento de la temperatura disminuye la viabilidad de los microorganismos.

Cada microorganismo posee una temperatura óptima de crecimiento y desarrollo, por lo cual la cantidad de los microorganismos, puede variar dependiendo de su clasificación y características intrínsecas. Se ha observado una correlación negativa entre la concentración de oxígeno y la viabilidad, que aumenta con la deshidratación y el tiempo de exposición. La causa de esta inactivación podría ser los radicales libres de oxígeno. La atmósfera contiene muy poca concentración de materia orgánica, y en la mayoría de los casos, es insuficiente para permitir el crecimiento heterotrófico. El agua disponible es escasa por lo que, incluso el crecimiento de microorganismos autótrofos está limitado.

La aeración es un factor que incide en el estado de conservación de los objetos presentes en los ambientes interiores. Cuando un local está bien ventilado, se evapora la humedad y se reduce la temperatura superficial, modificándose estos dos factores ambientales de los que depende el crecimiento microbiano. El aire estancado favorece considerablemente la propagación de los microorganismos, así como su deposición en superficies, alimentos, agua y tierra, mientras que el aire circulante no solo contribuye a impedir que los microorganismos suspendidos en él se depositen, sino que ayude a mantener seco el local, de ahí que la ventilación es esencial para lograr una baja actividad biológica en los ambientes internos.

Entre los elementos que componen la atmósfera tenemos el polvo, que es un factor tóxico en la misma, ya que esta siempre cargado de esporas de microorganismos y estas constituyen el componente mayoritario. Como los componentes del polvo, tanto químicos como biológicos, pueden dañar los materiales, éste debe ser retirado periódicamente para prevenir el biodeterioro.

El polvo que contiene componentes biológicos, se deposita sobre los materiales por diferentes vías, siendo una vía de infección cuando las condiciones atmosféricas sean tales que favorezcan el desarrollo de microorganismos. Además, contiene huevos de insectos y esporas de microorganismos, que pueden ingresar al torrente respiratorio.

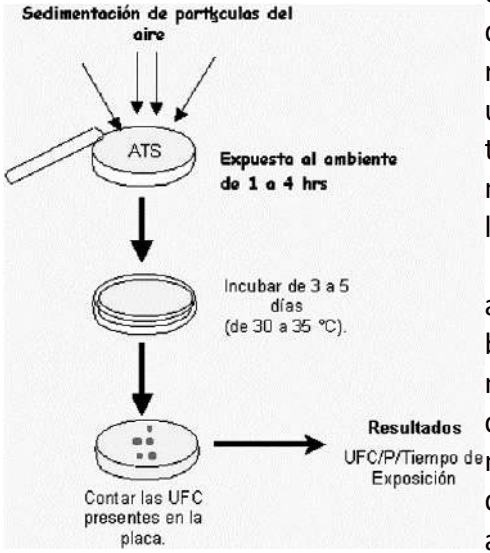
Analizados todos estos pormenores, vemos que un correcto PMA, debe incluir la evaluación de la calidad microbiológica del aire, que puede realizarse mediante métodos activos y pasivos. Los **métodos activos o volumétricos** utilizan dispositivos para tomar un volumen definido de aire y luego determinar las unidades formadores de colonias (UFC) presentes en él. Un ejemplo de estos dispositivos es el centrífugo de Reuter, el cual tiene una turbina que aspira el aire y hace que las partículas impacten sobre una tira de agar colocada en la pared interna de la turbina. Es un dispositivo portátil y funciona con baterías.

Un sinnúmero de investigaciones se ha desarrollado en el campo del muestreo microbiológico del aire desde el punto de vista volumétrico y han permitido llegar a importantes conclusiones:

- La muestra mínima en superficies es de 100-125 cm2, a causa de la distribución no homogénea de los microorganismos. En el aire el número de muestreos debe ser la raíz cuadrada del volumen de la sala y el muestreo mínimo y máximo por placa debe ser 200 l

- No existe correlación entre los recuentos de superficies y los del aire que las rodea por la aparición de un factor que distorsiona contundentemente los resultados: la carga microbiana de las personas. Por ello, deben realizarse muestreos de aire y también de superficies.
- A menor caudal de muestreo, menor velocidad de impacto, menor efecto rebote y mayor recuperación de microorganismos.

El otro método más empleado en el monitoreo del aire es el **pasivo o por sedimentación en placas de Petri**. En este método los microorganismos viables presentes en el aire, son llevados a la superficie del medio sólido por las corrientes de aire presentes en el área. Es un método fácil de realizar y económico que nos permite obtener información sobre los microorganismos capaces de sedimentar en el aire. El aire es monitoreado mediante un método microbiológico pasivo aplicando la técnica de placa expuesta donde ocurre la sedimentación de partículas del aire. Dicha técnica consiste en exponer al ambiente la placa de Petri que contiene el medio Agar Triptona Soya (ATS) en un período de 1 a 4 horas. Pasado este tiempo, se incuba la placa de 3 a 5 días a las temperaturas entre 30 y 35 ºC, cuyo resultado indica el conteo de colonias expresado como unidades for- madoras de colonias (UFC) por placa por tiempo de exposición. Las técnicas actuales para el monitoreo de partículas viables en el aire están limitadas por:



a)- El equipamiento disponible.
b)- El tiempo necesario para demostrar la presencia de microorganismos en la muestra del aire tomada.
c)- La incapacidad para reprobar el ambiente de un modo oportuno para la garantía de los resultados.
d)- Las dificultades en el monitoreo continuo del ambiente debido a las consideraciones tales como secar fuera de los medios de cultivos.

El monitoreo ambiental permite a las empresas adoptar un enfoque proactivo con respecto a la descomposición microbiana, en lugar de abordar las fallas de manera retrospectiva a medida que se producen. Esto es de especial importancia en los sistemas de gestión de la calidad, ya que los incidentes de descomposición suelen surgir esporádicamente y, sin mediciones de referencia coherentes, los problemas subyacentes o crónicos pueden pasar inadvertidos. El monitoreo ambiental se utiliza a menudo como actividad de verificación de los regímenes de saneamiento, ya que el ambiente de procesamiento es uno de los principales factores que contribuyen a las fallas de calidad microbianas que los fabricantes tratan de controlar. Un saneamiento ambiental deficiente aumenta el riesgo de incidentes de descomposición microbiana no intencionados.

Los microorganismos deterioradores y su importancia en el ambiente de procesamiento de alimentos Los ambientes de procesamiento de alimentos no son estériles, y los microorganismos que colonizan esos entornos suelen estar bien adaptados para utilizar el producto alimenticio manufacturado como sustrato para su proliferación. Esta adaptación aumenta el riesgo de descomposición si se produce una contaminación cruzada. Además, los microorganismos deterioradores específicos de las plantas suelen adaptarse para resistir los controles de producción específicos de las plantas.

Las bacterias y los hongos tolerantes al calor se aíslan con mayor frecuencia de los productos y plantas con procesos térmicos. Las levaduras resistentes a los conservadores se aíslan con mayor frecuencia de las plantas que utilizan tales conservadores. El uso a largo plazo de desinfectantes que no son de amplio espectro o las prácticas de limpieza deficientes también pueden dar lugar a niveles más altos de microorganismos deterioradores asociados a ambientes. El poder de la presión selectiva puede hacer que el entorno albergue microbios deterioradores problemáticos.

La descomposición microbiana puede causar una disminución de la vida útil, propiedades organolépticas inferiores y, en algunos casos, retiros de productos. Estos resultados tienen importantes consecuencias económicas y de percepción para los consumidores. Determinados métodos de producción o tipos de productos están asociados con ciertos microorganismos de deterioradores. Las plantas deben considerar qué microorganismos deterioradores son más pertinentes, según estos parámetros, para determinar si es más apropiado el uso de una estrategia de monitoreo ambiental selectiva, que se centre en un tipo o clase específicos de microorganismos, o una estrategia de monitoreo ambiental más generalizada, que se base en microorganismos indicadores significativos sea más relevante. Por ejemplo, las plantas de llenado en caliente probablemente se ocuparán de mohos resistentes al calor como parte de su programa de monitoreo ambiental.

La resiliencia de los microrganismos deterioradores a los procesos de inactivación utilizados, la tolerancia de esos deterioradores a las condiciones de formulación y la afinidad de esos microorganismos a materias primas debe de ser evaluada en la identificación de microorganismos deterioradores específicos. Los microorganismos deterioradores pertinentes suelen agruparse mediante una combinación de taxonomía, función y métodos de detección. Los grupos que comúnmente se utilizan incluyen: **los hongos y levaduras, el recuento total en placa y las bacterias ácido lácticas.**

Los **hongos y levaduras** (Flora micótica total), como vimos, son organismos eucarióticos de descomposición que son muy resistentes a muchos controles de procesamiento y formulación, persisten y se propagan incluso en condiciones ambientales extremadamente duras. Las levaduras, eucariotas unicelulares que se observan con estructura similar a las bacterias en una placa de Petri o bajo el microscopio, son resistentes a un pH bajo y están particularmente asociadas con la descomposición de alimentos de alta actividad acuosa y/o con alto contenido de azúcar, como los jugos pasteurizados, los jarabes, las frutas frescas cortadas y el yogur. La transmisión de las levaduras se produce a menudo a través de los alimentos, las bebidas o los vectores.

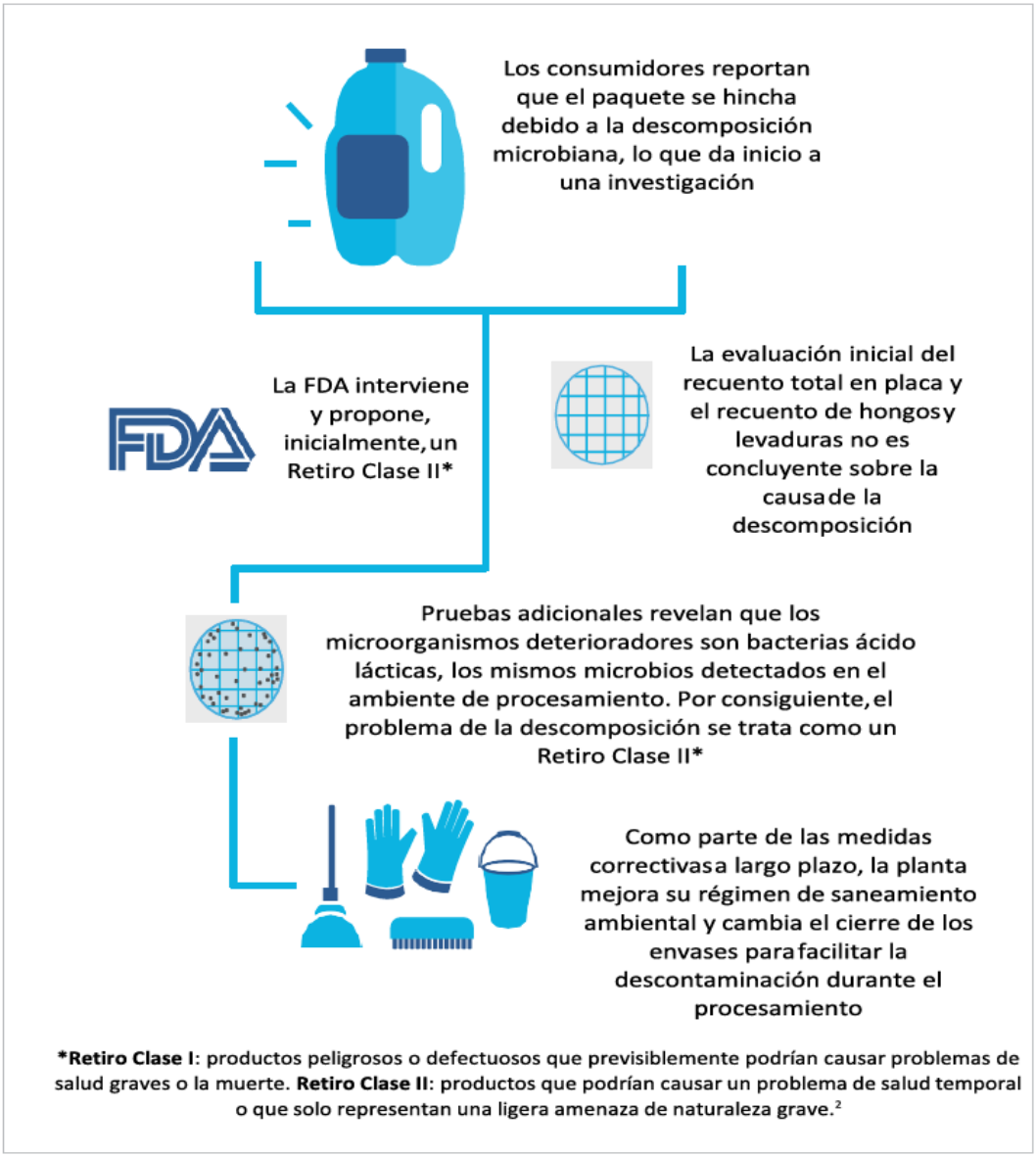
Los hongos filamentosos (mohos) son resistentes a un pH bajo, a la actividad del agua, y algunos son extremadamente resistentes al calor. Se les asocia particularmente con productos estables o de vida útil extendida (ESL, extended shelf-life), aquellos alimentos que han sido procesados y formulados a fin de controlar otros microorganismos deterioradores de más rápido crecimiento. La transmisión de mohos se produce frecuentemente a través del aire debido al alto potencial de generación de aerosoles de las esporas, además de los otros mecanismos pertinentes a todos los microorganismos deterioradores.

El **recuento total en placa** (TPC, Total Plate Count), o más exactamente, el recuento total de aerobios mesófilos en placa, se refiere a todos los microorganismos cultivables recuperados en medios ricos y complejos en condiciones aeróbicas. El TPC puede utilizarse como indicador de **saneamiento general** y para evaluar la carga microbiana total en el ambiente de procesamiento. La detección mediante este método puede ser específicamente pertinente para los productos altamente perecederos sujetos a descomposición debido a un conjunto de diversos microorganismos comensales, en lugar de los productos que soportan el crecimiento de solo unos pocos microorganismos deterioradores. Los resultados del TPC suelen estar dominados por la proliferación bacteriana, que supera a los hongos de crecimiento más lento. Los diseños de ambientes de procesamiento que son sensibles a la contaminación ambiental también se pueden evaluar provechosamente con el TPC. Estos sistemas podrían incluir áreas de llenado, reservorios de agua en procesos de enfriamiento y nichos difíciles de limpiar en las líneas de producción.

Las **bacterias ácido lácticas** representan un conjunto diverso y funcional de bacterias que causan la descomposición de la carne fresca y los productos cárnicos, los productos listos para el consumo (RTE, ready-to-eat), como la fruta fresca cortada y los fiambres envasados en atmósfera modificada (MAP, modified atmosphere packed), la cerveza y el vino. La descomposición se caracteriza por la presencia de metabolitos de agua de procesamiento o limpieza, o debido a prácticas de saneamiento insuficientes, mal sabor que se producen durante el crecimiento microbiano, en particular el ácido láctico. Las bacterias ácido lácticas homofermentativas producen exclusivamente ácido láctico como subproducto de su actividad metabólica, mientras que las bacterias ácido lácticas heterofermentativas sintetizan de forma variable ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono y otros metabolitos organolépticos. Las bacterias ácido lácticas son un reto importante para la industria cárnica, ya que la carne es un producto de alto valor y muy perecedero, que se asocia comúnmente con la descomposición por bacterias ácido lácticas. Por lo tanto, es una de las relaciones producto/descomposición mejor estudiadas y los defectos de calidad están bien caracterizados.

La descomposición debido a la proliferación de las bacterias ácido lácticas puede reconocerse por los sabores y aromas desagradables, la formación de películas viscosas (dextrano) y la hinchazón de los envases debido a la producción de dióxido de carbono por las cepas heterofermentativas. Las bacterias ácido lácticas se encuentran en todas partes; la contaminación proviene del ambiente y puede mitigarse a través de estrictas prácticas de saneamiento del entorno y de los utensilios, junto con el control de las condiciones de almacenamiento durante la vida útil.

Cronología del retiro de productos por descomposición de un fabricante hipotético de alimentos lácteos de EEUU



Desarrollo de un programa de muestreo de microorganismos deteriorantes

Un programa reglamentario de monitoreo ambiental puede orientarse a las áreas problemáticas para reducir la descomposición a corto plazo, y permite realizar un seguimiento y analizar la tendencia para controlar las amenazas a la calidad a largo plazo. Esto sirve de apoyo para el análisis de causas raíz y puede ayudar a distinguir entre las fallas en las políticas y las fallas en la ejecución de las mismas. Los planes de muestreo deben estructurarse en torno a varios factores:

- Identificación de un objetivo microbiano apropiado.
- Selección de los puntos de muestreo.
- Determinación de la frecuencia del muestreo.
- Establecimiento de niveles máximos factibles y correcciones asociadas.

Los programas de muestreo deben ser viables para la planta, y las decisiones en torno a estos parámetros puede que necesariamente involucren a varios miembros del equipo de calidad de los alimentos. Las plantas también deben considerar el método de detección más apropiado para el microorganismo de descomposición de interés. Las plantas que tienen como objetivo los mohos que producen esporas que se aerosolizan con facilidad pueden contemplar el uso de métodos de muestreo del aire para monitorear la carga de esporas.

La calidad microbiana del aire puede evaluarse mediante un muestreo cuantitativo del aire o con el método de sedimentación en placa. En la elaboración de un plan de monitoreo debe tenerse en cuenta tanto el lugar como el momento del muestreo. Las zonas de gran circulación de aire, de alta sensibilidad (es decir, con el producto expuesto) o de alta prevalencia microbiana (por ejemplo, el área de despaletización) son lugares adecuados para la toma de muestras del aire. El monitoreo ambiental de las superficies, como ya vimos, se puede lograr mediante placas de recuento por contacto directo y placas de contacto indirecto a través del uso de esponjas. En el caso de la verificación del saneamiento, esta se basaría en la selección de una variedad de puntos de muestreo cambiantes, junto con controles específicos de sitios difíciles de limpiar. Mientras que los enfoques de búsqueda y destrucción para eliminar microorganismos deterioradores específicos deben centrarse en los mecanismos de transmisión y las posibles fuentes asociadas con el organismo concreto, como se describió anteriormente.

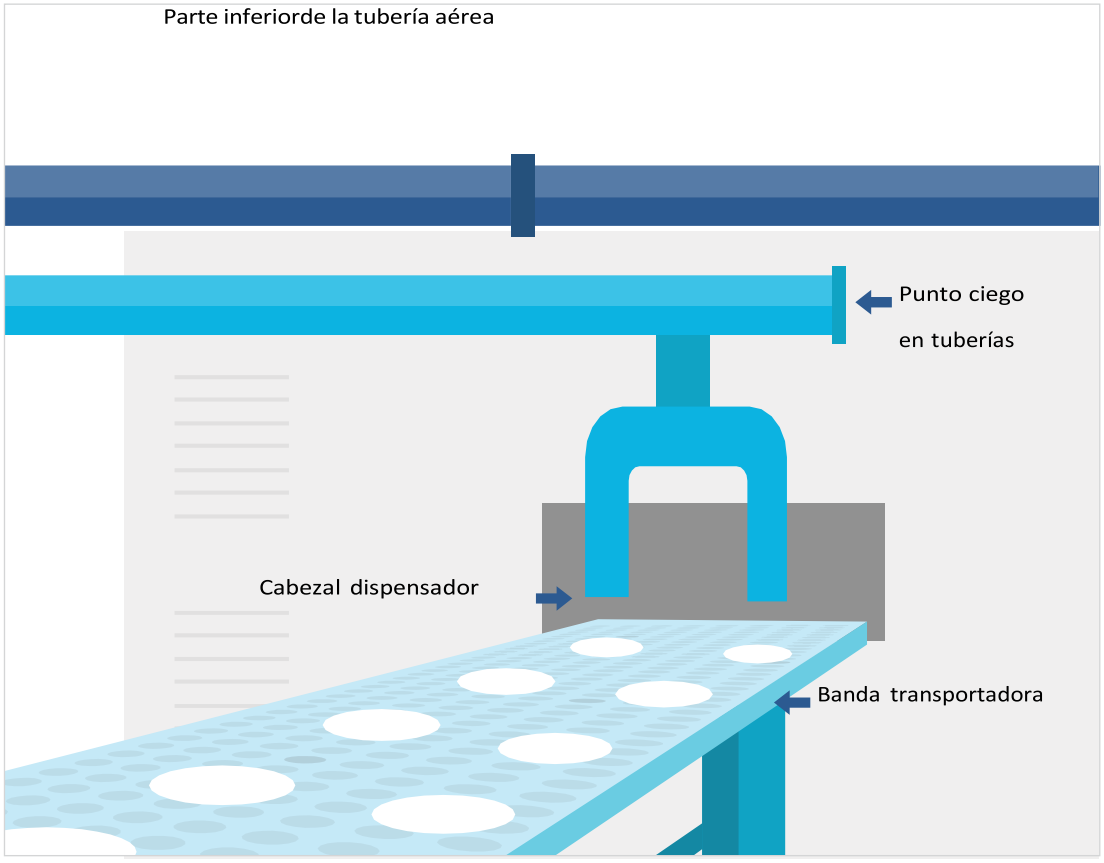
En términos generales, el hisopado de áreas grandes, comparado con la investigación de nichos pequeños comúnmente muestreados en los programas específicos para *Listeria*, demuestra mejoría en la mejora del programa de monitoreo ambiental para la prevención del deterioro de los alimentos. Los hisopos ambientales pueden servir a un doble propósito ya que los microorganismos deterioradores y los patógenos, o sus indicadores, pueden detectarse a partir de una sola muestra. Sin embargo, en algunos casos, la selección del punto de muestreo puede variar entre los programas de monitoreo ambiental de patógenos y de microorganismos deterioradores en función de la zona seleccionada.

Para el control de los microorganismos deterioradores, las plantas pueden optar por dirigir la actividad de muestreo a superficies cada vez más distantes de la producción de alimentos, ya que contribuyen a la contaminación cruzada. Las superficies de la Zona 2, como las tuberías aéreas directamente sobre las superficies de contacto con los alimentos, las superficies de la Zona 3, como las aspas de los ventiladores y los depósitos de agua en sitios de refrigeración, y las superficies de la Zona 4, como los conductos de entrada de aire, representan áreas propensas a albergar microorganismos deterioradores problemáticos, dependiendo de las plantas.

Además, las superficies de la Zona 1 se incluyen fácilmente en un programa de monitoreo ambiental centrado en los microorganismos deterioradores, y los resultados pueden servir de base para intervenciones de saneamiento que también se refieren a la inocuidad. En la Tabla 1 figura una lista de las zonas problemáticas comunes en las plantas de procesamiento que surgen en las cuatro zonas.

Punto	Amenaza para la calidad	Zona
Punto ciego en tuberías	La falta de flujo turbulento conduce a la acumulacióny crecimiento de bacterias y levaduras que causan la descomposición.	1
Banda transportadora	Equipo complejo que puede entrar en contacto directo conel producto y que también puede incluir rodillos huecos, soldaduras rugosas y microfisuras. Además, el rociado excesivo por los empleados durante el saneamiento puede contaminar este equipo y contribuir a la contaminación cruzada.	1+
Depósitos de agua en zonas de refrigeración	El desarrollo de biopelículas contribuye a la contaminación posterior al procesamiento de productos llenados en caliente o procesos en retorta.	2
Aspas de ventiladores	La acumulación de esporas de hongos y partículas de polvo conduce a su circulación, a través de las corrientes de aire, en el entorno de producción.	3
Salidas de aire		
Sellos o juntas de refrigeradores	Sitio de refugio, particularmente asociado con el moho de la maquinaria, que es difícil de limpiar sin una atención dedicadaen el programa maestro de saneamiento.	3

En el gráfico de abajo, un producto horneado sale de un horno en una banda transportadora, mientras se añade una cobertura con un dispensador. Por encima de la línea se encuentra una tubería aérea en la que se forma condensación durante la producción. Las flechas de la figura indican los posibles puntos de muestreo de los microorganismos deterioradores en esta zona de producción

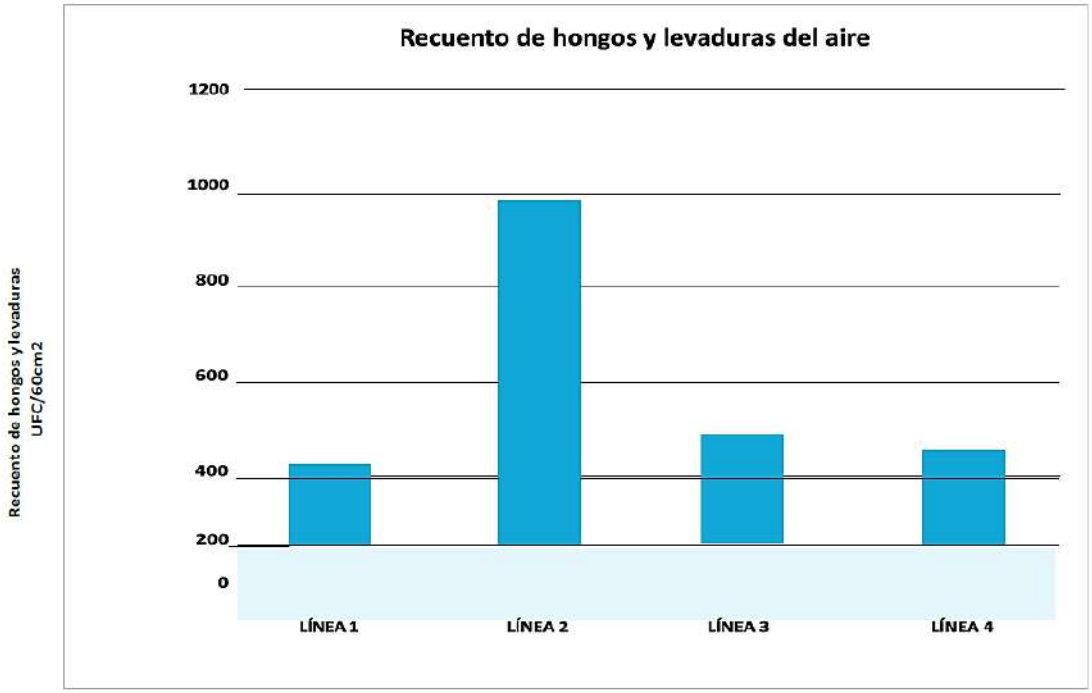


Tendencias y análisis de datos de los microorganismos deterioradores: Diferentes métodos de visualización permiten al equipo de calidad de los alimentos abordar diferentes preguntas. A menudo resulta útil presentar los datos de monitoreo ambiental de un período prolongado en forma de gráfico, de modo que las tendencias y los patrones se hagan evidentes en comparación con la visualización en una hoja de cálculo o como una colección de informes de muestreo. La clasificación de los datos en función de la fecha, la ubicación o el tipo de punto de muestreo puede abordar diversos problemas que pueden surgir en una planta de producción. Los fabricantes deben tomarse el tiempo necesario para analizar sus resultados a fin de aprovechar al máximo la implementación de un programa de monitoreo ambiental para detectar microorganismos deterioradores.

Ejemplo de visualización de datos de monitoreo ambiental: Recuento total en placa

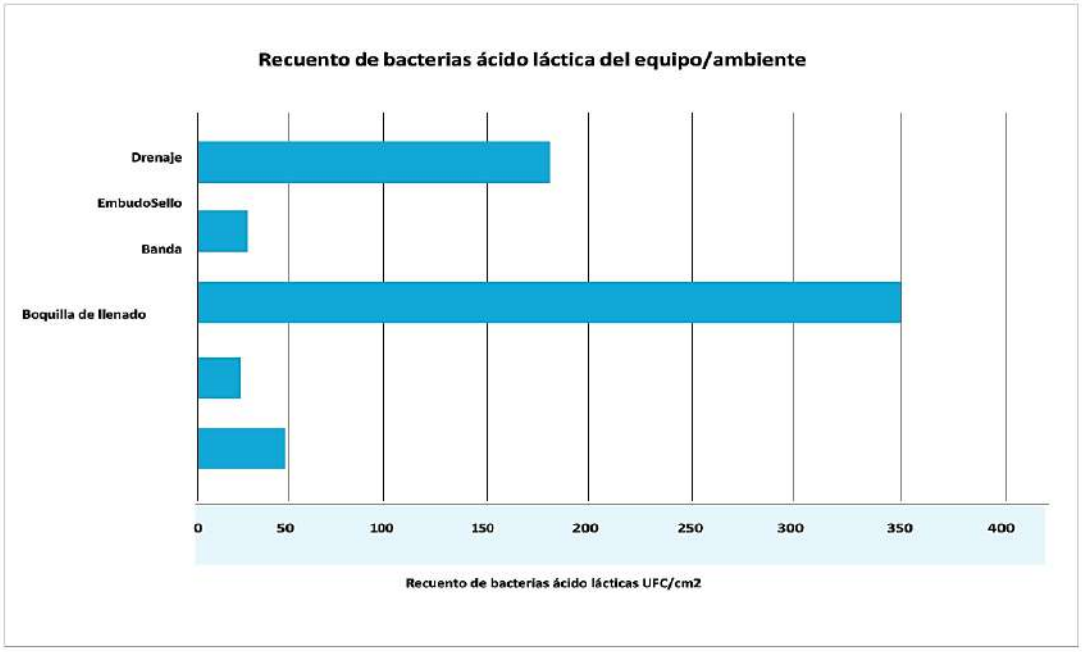
Este gráfico es una ilustración de los resultados del Recuento total en placa en un lugar en el transcurso de un año. Durante los meses de verano más cálidos (junio, julio, agosto), los conteos aumentan debido a la estación. A finales de noviembre, se puede observar un aumento significativo y agudo, lo cual es inusual para la temporada. Habría que realizar una investigación de la causa raíz para entender la causa de los resultados irregulares.

En el siguiente ejemplo de visualización de datos de monitoreo ambiental para Hongos y levaduras, vemos que sus recuentos en las muestras de aire de múltiples lugares de una planta, pueden monitorearse al comparar los recuentos uno al lado del otro mediante un gráfico de barras. En este ejemplo, los recuentos de la Línea 2 son más altos que los de los otros lugares, por lo que los alimentos que se producen en esta línea corren un mayor riesgo de contaminación por hongos y levaduras. Se pueden tomar medidas para mitigar el riesgo, determinando la fuente de hongos y levaduras, colocando equipos para proteger el producto de la contaminación o implementando un proceso para eliminar hongos y levaduras después de este punto de la producción.



Ejemplo de visualización de datos de monitoreo ambiental: Bacterias ácido lácticas

En este gráfico, se han monitoreado los recuentos de bacterias ácido lácticas en varios lugares. Si un producto terminado está contaminado, esta información puede ser útil para iniciar la investigación para determinar la causa raíz de la falla. En este ejemplo, los recuentos de bacterias ácido lácticas en un sello son más altos de lo esperado y el sello debe revisarse para determinar si se trata de grietas o una limpieza inadecuada.



Determinación de los niveles máximos para los microorganismos deterioradores: Los niveles máximos o de corte son los estándares cuantitativos que delimitan los resultados aceptables para el programa de monitoreo ambiental, y se establecen mejor a través de la experiencia en la planta. A fin de tomar una decisión informada sobre los niveles adecuados, debe hacerse un seguimiento de los resultados del programa de monitoreo ambiental de una planta durante 10 a 20 rondas de monitoreo. Estos datos crean una referencia a partir de la cual se puede observar la variación normal y se pueden extrapolar los niveles máximos. El método de referencia es particularmente adecuado para establecer los niveles máximos para los microorganismos indicadores y las evaluaciones microbianas cuantitativas. Por el contrario, los programas de monitoreo ambiental que se orientan a microorganismos deterioradores específicos con el objetivo de excluirlos totalmente del ambiente de procesamiento (por ejemplo, los mohos resistentes al calor) pueden optar por identificar la presencia de cualquier objetivo detectable lo suficiente como para iniciar una corrección. Una planta puede optar por estratificar sus niveles máximos y correcciones, sobre la base del tipo de superficie en la cual se tomó la muestra. Por ejemplo, un TPC de referencia adecuado para un desagüe probablemente difiera del de una superficie de contacto con alimentos. El inicio de una respuesta correctiva debe ser apropiado para los resultados.

Los programas de monitoreo ambiental a menudo se vuelven costosos para las empresas cuando se ordenan niveles máximos ineficaces o medidas correctivas demasiado exigentes. Dado que los programas de monitoreo ambiental son en gran parte preventivos en lugar de reaccionarios, las tendencias sostenidas en la detección de microbios también pueden justificar una investigación. Como se dijo anteriormente, se esperan ligeras variaciones en los recuentos y en los cálculos de referencia guía, pero las plantas pueden preferir adoptar una política en la que una tendencia al alza de 5 a 10 eventos de muestreo consecutivos puede derivar en una corrección antes de alcanzar los niveles máximos permitidos.

Parámetros	**Gérmenes totales**	**Mohos y levaduras**
Temperatura	37 ºC	30 ºC
Tiempo	48 horas	72 horas, repetir lectura a los 5 día.

Las colonias que se han desarrollado en una placa de cultivo tienen su origen en un germen o grupo de gérmenes que pasan a través de la criba, y es imposible distinguir si la formación de una colonia se ha debido a un solo germen o a varios gérmenes que han pasado a través del mismo orificio. Por tanto, no puede establecerse una relación directa entre las ufc desarrolladas en una placa de cultivo y el número de microorganismos por m^3.

La ley de Feller efectúa una corrección estadística que permite cuantificar para cada orificio de la criba el número de gérmenes que lo han atravesado. De este modo a partir de las ufc desarrolladas en la placa de cultivo se obtiene el Número Más Probable (NMP) de gérmenes que han impactado sobre el medio de cultivo, y conociendo el volumen de aire filtrado se obtiene el NMP de gérmenes por metro cúbico.

Interpretación de resultados y límites críticos: Para calificar la calidad ambiental en una sala de trabajo en la industria alimentaria, deben establecerse límites críticos que determinen las condiciones correctas. Para industrias alimentarias no existe una normativa que determine estos límites, por ello Betelgeux ha establecido sus propias especificaciones, basadas en resultados obtenidos en distintas series analíticas realizadas en industrias alimentarias, a las que se ha sometido a un tratamiento estadístico. Las series analíticas se realizaron en salas donde se efectúan diariamente tareas de Limpieza y Desinfección, validadas y consideradas correctas; incluyendo procedimientos específicos para desinfección ambiental. Los límites críticos obtenidos son los siguientes:

Especificaciones para mohos en industrias alimentarias

Recuentos (ufc/m³)	Nivel
0-100	Limpio
101-140	Aceptable
141-200	Contaminado
>201	Muy Contaminado

En industria la alimentaria, los niveles pueden variar en función del riesgo de la sala y del alimento que se manipule en ella. En función del tipo de sala, se pueden recomendar los niveles fúngicos descritos en la tabla siguiente:

Sector de actividad	Tipo de sala	Volumen muestreado	Recomendaciones ufc/m³	Tipo de flora
Pastelería industrial	Enfriamiento	500 a 1000 l	50	Fúngica
Quesería	Fabricación	50 a 100 l	1000	Fúngica
Quesería	Secadero	100 a 250 l	200	Fúngica
Elaborados cárnicos	Sala blanca	1000 l	<10	Total
Embutidos	Secadero	50 a 100 l	1000	Total y fúngica

Medidas correctivas basadas en los resultados de los microorganismos deterioradores: Cuando se superan los niveles máximos permitidos, deben iniciarse correcciones a corto plazo y medidas correctivas a largo plazo. Las correcciones inmediatas incluyen universalmente un paso de saneamiento, que o bien se centra en un lugar concreto o bien es una limpieza general profunda. Se debe documentar un procedimiento que detalle los pasos y el enfoque de las prácticas de limpieza iniciadas después de superar los límites máximos establecidos de monitoreo ambiental, y se debe capacitar a los empleados responsables de la interpretación de los resultados del monitoreo ambiental y del inicio de las correcciones para que asuman estas responsabilidades.

Muchas plantas optan por incluir un paso de remuestreo en sus correcciones después de este procedimiento de saneamiento para verificar que el contaminante haya sido eliminado o reducido a un nivel aceptable. Se recomienda incluir este sitio, además, en el siguiente ciclo de monitoreo para determinar si se eliminó la fuente o la causa de la contaminación o si, por el contrario, el mismo lugar se vuelve a contaminar. Las soluciones a largo plazo y el análisis de las causa raíz deben basarse en los datos de varios ciclos de observación, y pueden incluir una nueva capacitación de los empleados, la evaluación de los limpiadores y desinfectantes, la modificación de los procedimientos de limpieza y desinfección o los programas de saneamiento y la implementación de los cambios pertinentes en la producción.

Estas medidas correctivas pueden depender de la aversión al riesgo de la empresa y de la probabilidad de que se produzca un problema de descomposición después de las observaciones de monitoreo ambiental.

Tanto la probabilidad como la gravedad de la posible descomposición del producto deben utilizarse para determinar si es necesario reprocesar o destruir el producto terminado. Esto debe registrarse en una política con el programa de monitoreo ambiental antes de que se produzca cualquier incumplimiento de los niveles máximos establecidos. Algunos establecimientos también optan por aumentar el número o la frecuencia de sus muestreos tras una violación de sus niveles máximos. Esto, en teoría, podría dirigir el saneamiento selectivo hacia la fuente de contaminación mediante la toma de muestras de vectores a partir de las pruebas de ATP, pero también aumenta el nivel de control que una planta tiene sobre el mantenimiento de un nivel sanitario aceptable en su entorno de producción.

Identificación de las fuentes de los microorganismos deterioradores: La identificación de las áreas de la planta de procesamiento contaminadas con microorganismos deterioradores es una estrategia útil de gestión de la calidad. Sin embargo, si no se elimina la fuente puntual, estos microorganismos pueden volver a introducirse de forma constante en el sistema. La detección continua de niveles problemáticos de microorganismos deterioradores en el mismo sitio puede indicar problemas subyacentes adicionales que no se están abordando mediante el saneamiento de rutina o especializado del lugar. Las plantas deben considerar sus niveles de riesgo para la introducción de microorganismos deterioradores de diversas fuentes. Entre las fuentes comunes se encuentran las materias primas de mala calidad, que pueden reintroducir continuamente microorganismos en el entorno durante cada ciclo de producción.

La selección y el diseño de los equipos también pueden jugar en contra del sistema de monitoreo ambiental si permite la contaminación cruzada, o incluso si no logra descartar activamente los contaminantes. El aislamiento de las actividades, la antigüedad de los equipos y del edificio, y el grado de encierro de los procesos son todos factores que tienen un efecto en la microbiota ambiental y en la probabilidad de contaminación. Tener en cuenta los resultados a largo plazo del programa de monitoreo ambiental para microorganismos deterioradores en la elaboración de programas de mantenimiento preventivo y de proveedores aprobados.

14. Bibliografía general

- Swainson, Marcos. *Swainson's Handbook of Technical & Quality Management for the Food Manufacturing Sector*. Serie editorial Woodhead en Ciencia de los Alimentos, Tecnología y Nutrición. Elsevier (2018). Además: Wayne Labs. "Sistemas de gestión de seguridad alimentaria: las herramientas adecuadas permiten el éxito a largo plazo". *Revista Ingeniería de Alimentos*. 9 de junio de 2014.
- https://www.foodengineeringmag.com/articles/92394-food-safety-management-systems.
- Powell, Douglas A., Casey J. Jacob y Benjamin J. Chapman. "Mejora de la cultura de seguridad alimentaria para reducir las tasas de enfermedades transmitidas por los alimentos", *Food Control* 22, no. 6 (2011): 817–822.
- https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.009.
- Lee, J. C., A. Daraba, C. Voidarou, G. Rozos, H. A. E. Enshasy y T. Varzakas. "Implementación de Sistemas de Gestión de Seguridad Alimentaria junto con Otras Herramientas de Gestión (HAZOP, FMEA, Ishikawa, Pareto): El Estudio de Caso de *Listeria monocytogenes* y Correlación con Criterios Microbiológicos." *Alimentos* 10 (2021): 2169. https://doi.org/10.3390/ alimentos10092169
- https://www.mdpi.com/2304-8158/10/9/2169.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EE. UU. "Brote multiestatal de *listeriosis* vinculado a productos de cremas Blue Bell (actualización final)". 10 de junio de 2015.
- https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html.
- Informe de observación de la FDA de EE. UU. "Blue Bell Creameries Sylacauga AL Facility 04/06/2015–04/30/2015.
- https://www.fda.gov/media/91865/download.
- Informe de observación de la FDA de EE. UU. "Blue Bell Creameries Broken Arrow OK Facility 03/23/2015–04/23/2015.
- https://www.fda.gov/media/91871/download.
- Informe de observación de la FDA de EE. UU. "Blue Bell Creameries Brenham TX Facility 03/16/2015–05/01/2015.
- https://www.fda.gov/media/92059/download.
- Nalbone, L., L. Vallone, F. Giarratana, G. Virgone, F. Lamberta, S. M. Marotta, G. Donato, A. Giuffrida y G. Ziino. "Evaluación del riesgo microbiano de los helados industriales comercializados en Italia". *Ciencias Aplicadas* 12 (2022): 1988.
- https://doi.org/10.3390/app12041988.
- Donato, G., A. Giuffrida y G. Ziino. "Evaluación del riesgo microbiano de los helados industriales comercializados en Italia". *Ciencias Aplicadas* 12 (2022): 1988.
- Kozak, J., T. Balmer, R. Byrne, K. y K. Fisher. "Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos: Incidencia en productos lácteos". *Food Control* 7 (1996): 215–221.
- "El experto en ciencias de los alimentos explica por qué *la Listeria* aparece con más frecuencia en los retiros de alimentos". K-State News, Universidad Estatal de Kansas. 5 de mayo de 2015.
- https://www.k-state.edu/media/newsreleases/may15/listeriarecalls5515.html.

- Macheka, Lesley, *et al*. "Barreras, beneficios y factores de motivación para la implementación del sistema de gestión de seguridad alimentaria en el sector alimentario en la provincia de Harare, Zimbabwe". *Food Control* 34, no. 1 (2013): 126–131.
- https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.019.
- "¿Qué son los sistemas de gestión de seguridad alimentaria?"
- https://chimerasystems.co.za/services/fsms/.
- Wallace, C. y S. Mortimore. "Requisitos previos para la seguridad alimentaria: PRP y PRP operativos". En: *HACCP*. Springer, Boston, 2013.
- https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5028-3_4.
- Wallace, C.A. y S.E. Mortimore, "Capítulo 3: HACCP". *Manual de Control de Higiene en la Industria Alimentaria.* 2ª Edición. Sawston, Reino Unido: Woodhead Publishing, 2016.
- https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00003-0.
- Wallace, C.W., W. H. Sperber, y S.E. Mortimore. *Seguridad alimentaria para el siglo 21: Gestión de HACCP y seguridad alimentaria en toda la cadena de suministro global*. 2ª Edición. Hoboken, Nueva Jersey: John Wiley & Sons, 2018.
- Makwela, M. "El pensamiento sistémico se puede utilizar para resolver problemas complejos de contaminación de alimentos". Centro de Excelencia en Seguridad Alimentaria. Bellville, Sudáfrica. 2016.
- Competencias del auditor de seguridad alimentaria de GFSI Edición 1. Noviembre 2013.
- https://mygfsi.com/wp-content/uploads/2019/09/GFSI-Food-Safety-Auditor-Competencies.pdf.
- Betelgeux Christeyns (2020). Gama Control de Biofilm. Biofilmtest.
- https://biofilmtest.com/eliminacion/. Consultado el 29 de enero de 2020.
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P.A., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A. (2017). Listeria mono-cytogenes Biofilms in the Wonderland of Food Industry. Pathogens, 6, 41.
- doi.org/10.3390/pathogens6030041.
- Lorenzo, F. (2019). Herramientas rápidas para el control microbiológico de superficies. Blog Betelgeux-Christeyns, 30 abril 2019.
- https://www.betelgeux.es/blog/2019/04/30/herramientas-rapidas-para-el-control-microbiologico-en-superficies/. Consultado el 27 de enero de 2020.
- Orihuel, E., Bertó, R. Canet, J.J., Lorenzo, F., Milvaques, A. (2013). *Listeria monocytogenes en industrias cárnicas. Cap. 4. Control de Listeria en la industria*. Ed. Betelgeux (Gandia).
- Puga, C. H., Dahdouh, E., SanJose, C., Orgaz, B. (2018). *Listeria monocytogenes Colonizes Pseudomonas fluorescens Biofilms and Induces Matrix Over-Production. Frontiers in microbiology*, 9, 1706.
- doi:10.3389/fmicb.2018.01706
- EHEDG, 2004. Criterios para el diseño higiénico de equipos.
- EHEDG, 2007. Hygienic design of closed equipment for the processing of liquid food.
- Ernesto Castañeda Martin, 2010. Aspectos higiénicos de los alimentos microbiológicamente seguros.
- Mettler Toledo, 2014. White paper principles of hygienic design.

- Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del consejo de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.
- Trends in Food Science & Technology 18 (2007) 48e58 Integration of hygienic and aseptic systems.
- UNE-EN ISO 1672 Maquinaria para procesado de alimentos. Conceptos básicos.
- Smith, Debra (2017). *Optimización de la seguridad alimentaria a través de un buen mantenimiento de los utensilios de limpieza*. Vínculo al artículo técnico:
- https://viewer.ipaper.io/vikan/white-papers/cleaning-tool-maintenance/cleaning-tool-maintenance-whitepaper-es/
- Kheradia, A. M. (2019). *Evaluating FDA Food Recalls with Sanitation as a Root Cause*. Terminology, 26, 59. Vínculo al póster académico:
- https://www.vikan.com/media/8428/2019_iafp-poster_amitmkheradia-us.pdf
- Remco (2020). *The Role of Manual Cleaning in Biofilm Prevention and Removal*. Vínculo al artículo técnico:
- https://go.remcoproducts.com/biofilms
- Franklin Guarisma https://www.linkedin.com/in/franklinguarisma/ Technical and Audit Manager at www.global-foodsafety.com
- Holah, J. T. (1999). Effective microbiological sampling of food processing areas. Guideline No. 20, Campden & Chorleywood Food Research Association.
- British Retail Consortium (2015), Norma mundial de seguridad alimentaria. 7.ª edición, enero de 2015.
- Directiva 2006/42/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (2006) relativa a las máquinas y por la que se modifica la Directiva 95/16/CE (refundición). Diario Oficial de la Unión Europea. 9.6.2006. L 157/24.
- DIN EN 1672-2 (2009). Maquinaria para el proceso de alimentos. Conceptos básicos. Parte 2: Requisitos de higiene.
- EN ISO 14159 (2002). Seguridad de las máquinas. Requisitos de higiene para el diseño de las máquinas.
- Guía n.º 8 del EHEDG (2004). Criterios higiénicos para el diseño de equipos. http://www.ehedg.org/?nr=110&lang=en.
- Guía n.º 32 del EHEDG (2005). Materiales de construcción para equipos en contacto con alimentos.
- European Brushware Federation (FEIBP): Professional Hygiene Brushware Charter. http://www.hygienebrush.com/ index.php/Charter/charter.html.
- Reglamento (CE) n.º 178/2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 1.2.2002. L 31/1.
- http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/
- Reglamento (UE) n.º 10/2011 de la Comisión sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos (que deroga la Directiva 2002/72/CE desde 2015). Diario Oficial de la Unión Europea, 2011. L 12/1.
- http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:012:0001:0089:ES:PDF,
- http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:220:0018:0018:ES:PDF.

- Reglamento (CE) n.º 1935/2004 sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea.
- FDA, CFR 21, Code of Federal Regulations. Current Good Manufacturing Practice in manufacturing, packing or holding human food. Title 21: Food and Drugs Part 110 – Sub-part C.
- http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/ cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=177&showFR=1.
- Elahi, S., and Gray, K. (2014). A project to establish whether carry-over of meat species occurs in UK meat processing plants during the GMP production of mince meat. Contract number: FA0137. Informe final, versión 4:
- 23 de abril de 2014. Número de informe LGC DNAS-13000036, http://multimedia.food.gov.uk/multimedia/pdfs/ enforcement/meat-species-project.pdf.
- Directiva 93/43/CEE del Consejo relativa a la higiene de los productos alimenticios. FAL n.º 43, 1994, pp. 97-133. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. N.º L 175, 19 de julio de 1993, pp. 1-11.
- http://faolex.fao.org/cgi-bin/
- Codex. 2020. Principios Generales de Higiene de los Alimentos CXC-1 1969. Revisión en el 2020.
- http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/es/
- OMS: CINCO CLAVES PARA LA INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS.
- https://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/en/5kys_Spanish.pdf
- Ing Quím Alberto Ibañez Neri. Responsable Técnico de Grupo Ino (Inoclean, Ibro Food Safety, Ibro Academy)
- Dr Santiago Pablo Baggini (www.bagginis.blogspot.com)
- https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/

SOMOS LO QUE HACEMOS REPETIDAMENTE. EXCELENCIA, POR LO TANTO, NO ES UN ACTO SINO UN HABITO"

ARISTÓTELES

Dr. Santiago Pablo Baggini

Médico Veterinario (Universidad Nacional de Rosario - Santa Fe - Argentina), especializado en temas de Seguridad Alimentaria, Bromatología y Microbiología de los Alimentos, según su currículo de grado, en 1983.

Cursó la I Maestría en Tecnología de los Alimentos (Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Católica de Córdoba - Argentina) durante 1999 y 2000.

Actualmente se desempeña como Docente a Distancia sobre Cursos e-learning en las siguientes Consultoras: QUALITY INTERNATIONAL (República Oriental del Uruguay); CESCAL (República Argentina), NUTRINFO (República Argentina); MARIFÉ MONTES LUNA e INICIATIVAS EMPRESARIALES (España).

Durante de 33 años, prestó servicios en el Ejército Argentino como Oficial del Servicio de Veterinaria, Auditor y Responsable Técnico en Seguridad Alimentaria. Participó en la Organización de las Naciones Unidas (ONU), Misión Minustah - Haití en junio de 2004 a febrero de 2005, como jefe de la Sección Sanidad del Batallón Conjunto Argentino 1; Civilans Affaires Oficer (Oficial de Asuntos Civiles), Seguridad Alimentaria y Ambiental; Medicina de Catástrofes y jefe del Hospital de Campaña Argentino, donde fue distinguido con medalla y diploma por su trabajo profesional.

Autor de un blog, un canal de You Tube y propietario de dos grupos científicos en Facebook y LinkedIn.

Autor de tres libros: Enfermedades Transmitidas por los Alimentos y Microbiología de Alimentos y Buenas prácticas en la industria de los alimentos.

Contribuidor principal en diferentes grupos científicos de opinión, nacionales y extranjeros sobre Seguridad Alimentaria ubicados en las distintas redes sociales profesionales vigentes.